

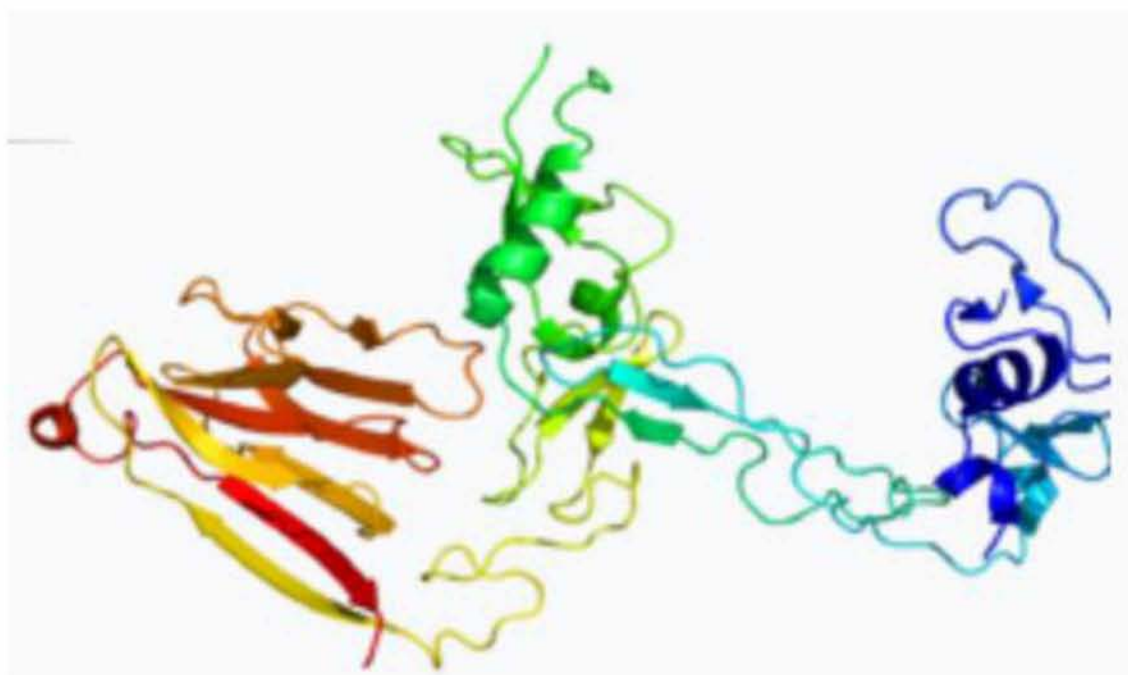


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



Διπλωματική εργασία

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
ADAMTS13 ΣΤΑ ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ»**



Μητριάδου Ευαγγελία

ΛΑΡΙΣΑ 2018

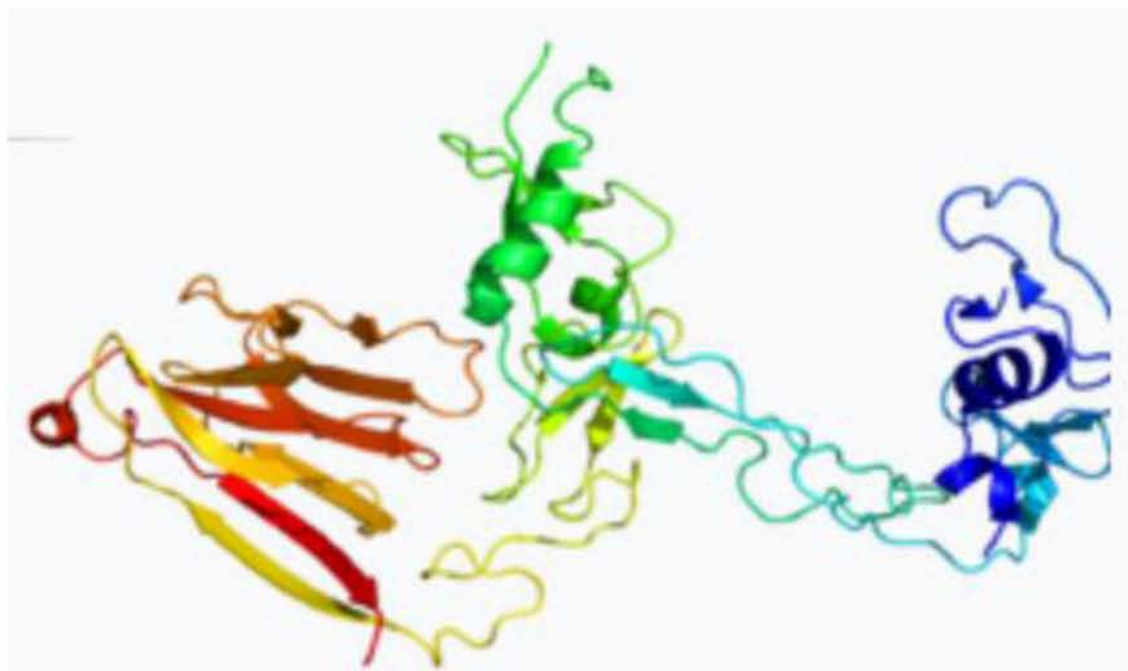


**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEP. OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY**



Diploma project

**«STUDY OF METALLOPROTEIN ADAMTS13 LEVELS IN THE
MYELOPROLIFERATIVE SYNDROMES»**



Mitriadou Evangelia

LARISA 2018

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Κυριάκου Δέσποινα, Καθηγήτρια Ιατρικής των Μεταγγίσεων του Τμήματος Ιατρικής
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωϊκών
Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής των Μεταγγίσεων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσά μου κυρία Κυριάκου Δέσποινα, Καθηγήτρια Ιατρικής των Μεταγγίσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που μου ανέθεσε το συγκεκριμένο ενδιαφέρον θέμα καθώς επίσης για τη στήριξη και τις συμβουλές της.

Ακόμη, θα ήθελα να απευθύνω ειλικρινείς ευχαριστίες στην κυρία Ψαρρά Άννα – Μαρία, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμπαράστασή της κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου. Επιπλέον, ευχαριστώ την κυρία Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που αποτελεί μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου.

Εν συνεχεία, επιθυμώ να ευχαριστήσω την κυρία Ερασμία Ρούκα, Βιολόγο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, για την υπομονή της και την βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στην ερευνητική μελέτη λύνοντάς μου οποιαδήποτε απορία και παρέχοντάς μου τις απαραίτητες επεξηγήσεις.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, η οποία με την ηθική και οικονομική στήριξη της, καθώς και με την υπομονή και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, με βοήθησε να ολοκληρώσω ένα μεγάλο και σημαντικό κομμάτι των σπουδών μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1. ADAMTS13.....	3
1.1 Οικογένεια ADAM πρωτεϊνών.....	3
1.2 Οικογένεια ADAMTS πρωτεϊνών.....	3
1.3 Ανακάλυψη ADAMTS13	3
1.4 Δομή της ADAMTS13	4
1.5 Χρωμοσωμική θέση της ADAMTS13	6
1.6 Δραστικότητα της ADAMTS13	7
1.7 Βιοσύνθεση της ADAMTS13	11
1.8 Παράγοντας von Willebrand (VWF)	12
1.9 Διάσπαση του VWF από την ADAMTS13	13
1.10 Αλληλεπίδραση ADAMTS13 με τον VWF	14
1.11 Γενετική ανεπάρκεια της ADAMTS13.....	18
1.12 Μεταλλάξεις γονιδίου ADAMTS13.....	18
1.13 Αιμορραγία και θρόμβωση	19
1.14 Ασθένειες και ADAMTS13	20
2. ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΚΑΙ ADAMTS-13.....	23
2.1 Μυελοΐπερπλαστικά σύνδρομα (MPD)	23
2.1.1 Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (CML).....	23
2.1.2 Αληθής Πολυκυτταραιμία (PV)	24
2.1.3 Βασική Θρομβοκυτταραιμία (ET).....	24
2.1.4 Μυελοϊνωμάτωση (MF)	24
2.1.5 Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία (CNL).....	24
2.1.6 Χρόνια Ηωσινοφιλική Λευχαιμία (CEL).....	25
2.1.7 Μαστοκυττάρωση	25
2.2 Θρόμβωση και αιμορραγία στην PV και στην ET.....	25
2.3 Φαινότυπος PV και ET	25
2.4 Παθογένεση PV και ET.....	26
2.5 Ανωμαλίες VWF αιμοπεταλίων σε μυελοΐπερπλαστικά σύνδρομα	28
2.6 Μοριακή διάγνωση μυελοΐπερπλαστικών νεοπλασμάτων	29
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	32

3.1 Σκοπός	32
3.2 Υλικά και Μέθοδοι	32
3.2.1 Οργανολογία	32
3.2.2 Υλικά και αντιδραστήρια	32
3.2.3 Τεχνικές	33
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	37
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with a ThromboSpondin type 1 motif, member 13) είναι πρωτεάση διάσπασης του παράγοντα von Willebrand (VWF) η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ αιμόστασης και θρόμβωσης. Η ADAMTS13 συντίθεται κυρίως στο ήπαρ αλλά παράγεται ακόμη και σε περιορισμένες ποσότητες από αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, μεγακαρυοκύτταρα και αιμοπετάλια, σπειραματικά υποκυτταρικά και γλοιακά κύτταρα, παρόλο που η φυσιολογική σημασία αυτών των πηγών δεν έχει καθοριστεί ακόμη. Ανεπάρκεια καθώς και λειτουργικές ανωμαλίες της ADAMTS13 θα έχουν ως αποτέλεσμα διάφορες σοβαρές διαταραχές. Τα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα (MPN) είναι μια ομάδα αιματολογικών κακοηθειών που χαρακτηρίζονται από αυξημένο αριθμό μυελοειδών αιμοκυττάρων. Οι κύριες αιτίες της ασθένειας και του θανάτου σε ασθενείς με MPN είναι οι αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις καθώς και αιμορραγικές επιπλοκές. Οι μοριακοί μηχανισμοί των μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων είναι ελάχιστα κατανοητοί και χρήζουν περαιτέρω μελέτης. Στη συγκεκριμένη εργασία, διερευνήθηκε μια πιθανή συσχέτιση των MPNs με την ADAMTS13 καθώς από προηγούμενες μελέτες υπονοήθηκε μια ενδεχόμενη σχέση. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι έρευνες που συνδέουν την ADAMTS13 με τα MPNs είναι ελάχιστες για αυτό και πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω εργασίες ώστε να αποδειχθεί πλήρως η συσχέτιση αυτή.

ABSTRACT

ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with a ThromboSpondin type 1 motif, member 13) is a von Willebrand factor cleavage protease (VWF) which is essential to maintain a delicate balance between haemostasis and thrombosis. ADAMTS13 is mainly synthesized in the liver but is produced even in limited amounts by vascular endothelial cells, megakaryocytes and platelets, glomerular subcellular and glial cells, although the physiological significance of these sources has not yet been determined. Deficiency as well as functional anomalies of ADAMTS13 will result in several serious disorders. Myeloproliferative neoplasms (MPN) are a group of hematologic malignancies characterized by an increased number of myeloid hemocytes. The main causes of illness and death in patients with MPN are arterial and venous thrombosis and haemorrhagic complications. The molecular mechanisms of myeloproliferative diseases are poorly understood and need further study. A possible correlation of MPNs with ADAMTS13 was investigated in this project, while previous studies suggested a possible relationship. Finally, it is important to mention that the studies linking ADAMTS13 to MPNs are minimal and further work needs to be done to demonstrate this correlation.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with a ThromboSpondin type 1 motif, member 13) είναι γνωστή ως πρωτεάση διάσπασης του παράγοντα von Willebrand (VWF). Είναι ένα ένζυμο (μεταλλοπρωτεάση) που περιέχει ψευδάργυρο και διασπά την μεγάλη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην πήξη του αίματος, τον VWF. Η σύνθεση της ADAMTS13 γίνεται κυρίως στο ήπαρ, εκκρίνεται στο αίμα και διασπά τα μεγάλα πολυμερή VWF που αγκυροβολούν στην ενδοθηλιακή επιφάνεια, στην κυκλοφορία και στις θέσεις αγγειακού τραυματισμού μειώνοντας έτσι τη δραστηριότητά τους.

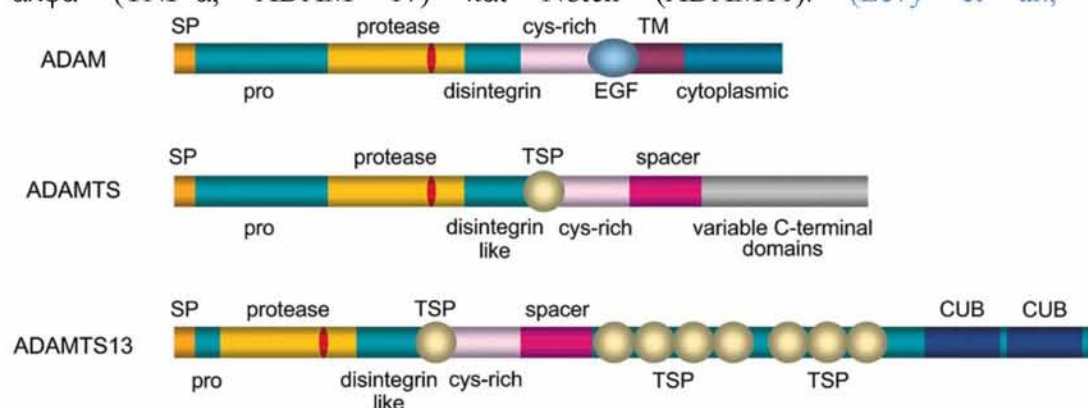
Η πρωτεολυτική διάσπαση του εξαιρετικά μεγάλου VWF από την ADAMTS13 είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ αιμόστασης και θρόμβωσης. Η αδυναμία διάσπασης του υπερβολικά μεγάλου VWF λόγω σοβαρής ανεπάρκειας δραστηριότητας της ADAMTS13 οδηγεί σε δυνητικά θανατηφόρα διαταραχή αίματος, τη θρομβωτική θρομβοκυτταροπενική πορφύρα (TTP). Η αδυναμία διάσπασης VWF επιτρέπει την συσσώρευση των εξαιρετικά μεγάλων VWF και την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων που τελικά προκαλούν την απόφραξη των αρτηριδίων και των τριχοειδών. Επιπλέον, η μειωμένη δραστηριότητα της ADAMTS13 στο πλάσμα σε συνδυασμό με την αυξημένη συγκέντρωση VWF στο πλάσμα είναι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη άλλων αρτηριακών και φλεγμονωδών ασθενειών ([Zander et al., 2015](#)). Τέλος, έχει γίνει αποδεκτό ότι η αυξημένη έκθεση του VWF στην ADAMTS13 για διάφορους λόγους προδιαθέτει σε αιμορραγία προκαλώντας αυξημένη αποικοδόμηση του VWF. Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζεται από μια μορφή νόσου von Willebrand (τύπος 2α).

Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί από διάφορους ερευνητές η πιθανή εμπλοκή της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS13 στα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα χωρίς όμως να υπάρχει σαφής επιβεβαίωση. Τα μυελοπλαστικά νεοπλάσματα (MPNs) είναι μια ομάδα αιματολογικών κακοηθειών που χαρακτηρίζονται από αυξημένο αριθμό αιμοκυττάρων, όπως αιμοπετάλια, ερυθροκύτταρα και ουδετερόφιλα. Οι κύριες αιτίες της ασθένειας και του θανάτου σε ασθενείς με MPN είναι οι αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις και, αντιστρόφως, οι αιμορραγικές επιπλοκές. Ωστόσο, οι παθογενετικοί μηχανισμοί είναι ελάχιστα κατανοητοί ([Etheridge et al., 2014](#)). Στα μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα περιλαμβάνονται: η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (αύξηση κυττάρων της μυελικής σειράς), η Αληθής Πολυκυτταραιμία (αληθής ερυθραιμία, αύξηση ερυθροκυττάρων), η Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία (υπερπλασία μεγακαρυοκυττάρων, αύξηση αιμοπεταλίων) η Πρωτοπαθής Μυελοϊνωση (αύξηση της ίνωσης του μυελού) καθώς και η Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία, η Χρόνια Ηωσινοφιλική Λευχαιμία, η Μαστοκυττάρωση και το υπερηωσινοφιλικό Σύνδρομο ([Λουκόπουλος, 2015](#)). Η καλύτερη κατανόηση των λειτουργικών μηχανισμών και δομών της ADAMTS13 θα προσφέρει νέα εργαλεία για τη διάγνωση και τη θεραπεία αυτών των δυνητικά θανατηφόρων ανθρώπινων ασθενειών.

1. ADAMTS13

1.1 Οικογένεια ADAM πρωτεϊνών

Η ADAMTS13 είναι το 13ο μέλος της οικογένειας των μεταλλοπρωτεασών ADAMTS, το οποίο σχετίζεται με τη μεγάλη οικογένεια ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease). Οι πρωτεάσες ADAM είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I και η δομή τους παρουσιάζεται αναλυτικά στην Εικόνα 1. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί περισσότερα από 30 μέλη της οικογένειας ADAM και αυτά τα μόρια εξυπηρετούν μια ποικιλία λειτουργιών που κυμαίνονται από σύντηξη σπέρματος-αυγού (ADAMs 1 και 2) μέχρι και αποβολή εξωκυτταρικών προσδεμάτων όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-άλφα (TNF- α ; ADAM 17) και Notch (ADAM10). (Levy et al., 2005)



Εικόνα 1. : Σχηματικό διάγραμμα των μεταλλοπρωτεασών ADAM, ADAMTS και της ADAMTS13.

Το SP υποδεικνύει σηματοδοτικό πεπτίδιο, pro: προπεπτίδιο, πρωτεάση: μεταλλοπρωτεάση (θέση μοτίβου δέσμησης ψευδαργύρου που απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα), Disintegrin: περιοχή ντισιντεγκρίνης, dis – like: περιοχή που μοιάζει με ντισιντεγκρίνη, πλούσιο σε cys: πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή, TSP: μοτίβα θρομβοσπονδίνης τύπου 1, EGF: επανάληψη τύπου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, TM: διαμεμβρανική περιοχή, CUB: επικράτεια CUB. [Levy GG, Motto DG, Ginsburg D (July 2005)]

1.2 Οικογένεια ADAMTS πρωτεϊνών

Παρόμοια με τις μεταλλοπρωτεάσες ADAM, τα μέλη της οικογένειας ADAMTS (συνολικά 19) παρουσιάζουν παρόμοια δομή: σηματοδοτικό πεπτίδιο - προπεπτίδιο - επικράτεια μεταλλοπρωτεάσης - περιοχή που μοιάζει με disintegrin. Σε αντίθεση με τις ADAM πρωτεάσες, οι ADAMTSs στερούνται EGF επαναλήψεων και μιας διαμεμβρανικής περιοχής και, ως εκ τούτου, δε δεσμεύονται στη μεμβράνη αλλά πιθανώς εκκρίνονται. Επιπροσθέτως, όλα τα μέλη της οικογένειας ADAMTS διαθέτουν ένα ή περισσότερα μοτίβα θρομβοσπονδίνης τύπου 1 (TSP1) και ποικίλες καρβοξυτελικές περιοχές. (Levy et al., 2005)

1.3 Ανακάλυψη ADAMTS13

Το 1996, οι Furlan (Furlan et al., 1996) και Tsai (Tsai, 1996) χρησιμοποίησαν χρωματογραφικές τεχνικές για την απομόνωση του VWF-cp (VWF-cleaving protease)

από φυσιολογικό ανθρώπινο πλάσμα με μερική μόνο επιτυχία. Εντούτοις, ήταν σε θέση να προσδιορίσουν τη θέση διάσπασης του VWF (ο δεσμός Tyr1605 και Met1606) με μερικώς καθαρισμένα υλικά μετά από μετουσίωση της πρωτεΐνης με ουρία 1,5M ή γουανιδίνη - HOI. Επιπλέον, απέδειξαν ότι η δραστηριότητα του VWF-cp στο πλάσμα αυξήθηκε δραματικά όταν προστέθηκε στην αντίδραση δισθενές μεταλλικό ιόν, αλλά παρεμποδίστηκε ή καταργήθηκε με την προσθήκη αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος, το οποίο δημιουργεί χηλικά μεταλλικά σύμπλοκα δισθενών ιόντων. Συνεπώς, συνήχθη το συμπέρασμα ότι ο VWF-cp πλάσματος είναι μεταλλοπρωτεάση.

Το 2001, αρκετές ομάδες απομόνωσαν ανεξάρτητα τον VWF-cp από το πλάσμα και κατέληξαν στη μερική αλληλουχία αμινοξέων του. Αυτό οδήγησε στην ταυτοποίηση του VWF-cp ως νέο μέλος της οικογένειας μεταλλοπρωτεασών ADAMTS. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον VWF-cp χαρακτηρίστηκε ως ADAMTS13 σύμφωνα με την επιτροπή ονοματολογίας γονιδίων HUGO. Το ίδιο γονίδιο αποδείχθηκε υπεύθυνο για συγγενή TTP με βάση την κλωνοποίηση θέσης και τα γενετικά τροποποιημένα γονίδια με επακόλουθη ανάλυση σύνδεσης. (Fujikawa et al., 2001; Gerritsen et al., 2001; Zheng et al., 2001)

Η ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ADAMTS13 εκφράστηκε γρήγορα σε επιμολυσμένες κυτταρικές σειρές ως πρωτεΐνη 195 kDa, ικανή να διασπά διαλυτά πολυμερή VWF και ULVWF (ultralarge von Willebrand factor) που απελευθερώθηκαν και αγκυροβολήθηκαν στο ενδοθήλιο. Η επιτυχία στην αναγνώριση γονιδίων, την κλωνοποίηση και την έκφραση της ανθρώπινης ADAMTS13 έδωσε έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση της βιολογίας και της παθογένεσης του TTP. (Zheng, 2015)

1.4 Δομή της ADAMTS13

Η ADAMTS13 είναι ένα από τα μεγαλύτερα μέλη της οικογένειας ADAMTS και παρουσιάζει τη χαρακτηριστική δομή επικρατειών. Σε αντίθεση με άλλα μέλη της οικογένειας, η αλληλουχία ADAMTS13 περιέχει 2 καρβοξυτελικές περιοχές CUB άγνωστης λειτουργίας. Οι περιοχές CUB βρίσκονται σε πολλές πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από την ανάπτυξη (π.χ. το τολοειδές πρωτεϊνικής μορφής της περιστροφικής μορφολογίας, η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 1 και οι σπερμαντερίνες) και μπορεί να παίζουν ένα ρόλο στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Τα μοτίβα TSP1 είναι επίσης γνωστά για να μεσολαβούν αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, ειδικά μεταξύ των πρωτεϊνών στην εξωκυτταρική μήτρα. Τέλος, οι επικράτειες όμοιες με ντισιντεγκρίνη είναι γνωστό ότι δεσμεύουν τις ιντεγκρίνες μέσω μιας RGD αλληλουχίας που είναι παρούσα εντός της πλούσιας σε κυστεΐνη περιοχής ADAMTS13. Έτσι, μέσω των πολλαπλών επικρατειών της, η ADAMTS13 έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσει με ένα ευρύ φάσμα μορίων. (Levy et al., 2005)

Επομένως η ADAMTS13 αποτελείται από:

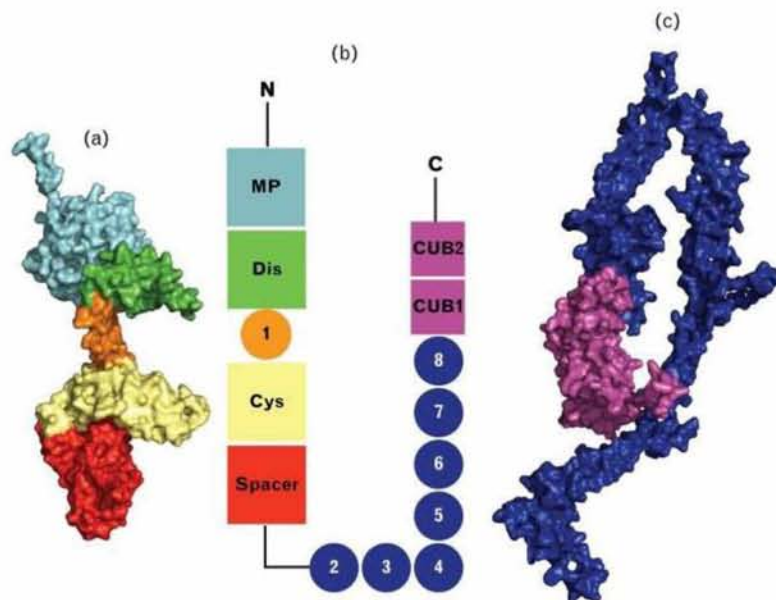
- μία επικράτεια πρωτεάσης (το μέρος που εκτελεί την πρωτεϊνική υδρόλυση),

- μία γειτονική επικράτεια disintegrin (ισχυρός αναστολέας της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων και της προσκόλλησης κυττάρων που εξαρτώνται από την ιντεγκρίνη)
- οκτώ επικράτειες θρομβοσπονδίνης (οικογένεια εκκρινόμενων γλυκοπρωτεϊνών με αντι-αγγειογενετικές λειτουργίες. Λόγω του δυναμικού τους ρόλου εντός της εξωκυτταρικής μήτρας, θεωρούνται πρωτεΐνες της μήτρας.)

Η θρομβοσπονδίνη 1 είναι μία υπομονάδα μιας ομοτριμερικής πρωτεΐνης συνδεδεμένης με δισουλφίδιο. Αυτή η πρωτεΐνη είναι μια συγκολλητική γλυκοπρωτεΐνη που μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου προς κύτταρο και κυττάρου προς μήτρα. Μπορεί να προσδένεται σε ινωδογόνο, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη, κολλαγόνο τύπου V και ιντεγκρίνες άλφα-v / βήτα-1. Έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη αυτή παίζει ρόλο στη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, την αγγειογένεση και την ογκογένεση (Εικόνα 2.).

Δεν έχει υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και επομένως δεν μπορεί να αγκυροβολήσει στην κυτταρική μεμβράνη.

Πιο πρόσφατα, οι Yeh et al. (Yeh et al., 2010) και Bao et al. (Bao et al., 2014) έδειξαν ανεξάρτητα ότι οι C-τελικές περιοχές TSP1 2-8 και CUB της ADAMTS13 μπορεί να έχουν δραστηριότητα αναγωγής δισουλφιδικού δεσμού. Αυτή η δραστηριότητα είναι ανεξάρτητη από την πρωτεολυτική δραστηριότητα της ADAMTS13. Έχει προταθεί ότι τόσο η πρωτεολυτική δραστηριότητα όσο και η δραστηριότητα αναγωγής δεσμού δισουλφιδίου μπορεί να απαιτούνται για βέλτιστη αντιθρομβωτική δραστηριότητα in vivo. (Zheng, 2015)



Εικόνα 2. : Δομή της ADAMTS13. (α) Μοντέλο ομολογίας (M) και μερική κρυσταλλική δομή (DTCS). (β) Σχηματική οργάνωση της ADAMTS13. (γ) Μοντέλο ομολογίας επαναλήψεων TSP1 2-8 και CUB. Η δομή της μεταλλοπρωτεάσης έχει μοντελοποιηθεί (modeled) από τον κωδικό 4WK7 της Protein Data Bank (PDB). Οι επαναλήψεις TSP1 2-8 μοντελοποιήθηκαν από τον κωδικό PDB 1W0R και οι περιοχές CUB μοντελοποιούνται από τον κωδικό PDB 3KQ4. Το TSP1 2 συνδέεται με τον τομέα αποστάτη. Η διαμόρφωση του TSP1 2-8 και των τομέων CUB είναι άγνωστη. Η περιοχή C τελικού άκρου περιλαμβάνεται για σύγκριση μεγέθους. CUB, συστατικά συμπληρώματος C1r και

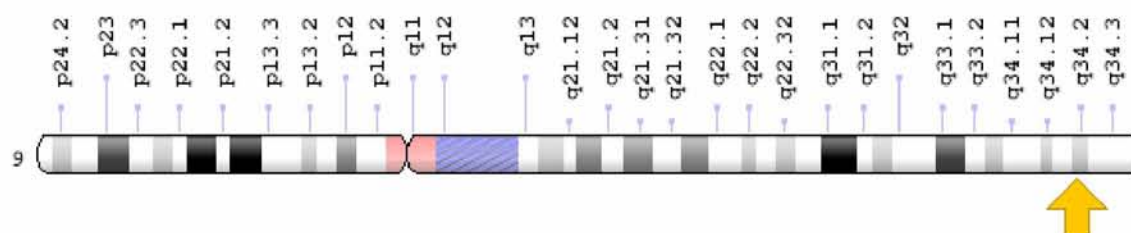
C1s, DTCS, περιοχή που μοιάζει με αποσυγκολλητίνη, μοτίβο τύπου θρομβοσπονδίνης, πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή και περιοχή αποστάσεως, TSP1, θρομβοσπονδίνη τύπου 1. (Zander et al., 2015)

Το προπεπτιδίο της ADAMTS13 περιέχει 41 αμινοξέα, σε αντίθεση με τα περίπου 200 αμινοξέα που περιλαμβάνουν τα προπεπτιδία των περισσότερων άλλων μελών της οικογένειας ADAM και ADAMTS. Επιπλέον, το προπεπτιδίο της ADAMTS13 δεν φαίνεται να περιέχει ένα πιθανό μοτίβο "διακόπτη κυστεΐνης". Αυτό το μοτίβο λειτουργεί σε άλλες μεταλλοπρωτεάσες για την αναστολή της δραστηριότητας πρωτεάσης σε συντονισμό με την ενεργή θέση Zn^{2+} στην περιοχή πρωτεάσης ώστε να διατηρηθεί το μόριο σε ανενεργή μορφή μέχρις ότου αποκοπεί το προπεπτιδίο (με ένζυμο τύπου φουρίνης) που συμπίπτει με την έκκριση από το κύτταρο (Wart et al., 1990). Σε αντίθεση με ό,τι έχει παρατηρηθεί για άλλες μεταλλοπρωτεάσες, η εξάλειψη του προπεπτιδίου της ADAMTS13 δεν εξασθενεί την έκκριση ή την ενζυμική δραστηριότητα, αποδεικνύοντας ότι το προπεπτιδίο δεν απαιτείται για αναδίπλωση ή έκκριση και πιθανώς δεν λειτουργεί για να διατηρήσει την ADAMTS13 σε ανενεργή μορφή. Ωστόσο, η "theADAMTS13" αλληλουχία προπεπτιδίου έχει συντηρηθεί σε όλο το εύρος της εξελικτικής απόστασης (από ψάρια σε θηλαστικά), γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να εξυπηρετεί μια ακόμη άγνωστη λειτουργία. (Levy et al., 2005)

Το ανθρώπινο γονίδιο ADAMTS13 περιλαμβάνει περίπου 29 εξόνια 37 kb γονιδιωματικής αλληλουχίας. Το ADAMTS13 cDNA προβλέπει μία πρωτεΐνη 1427 αμινοξέων με υπολογιζόμενο μοριακό βάρος 145 kDa, σε αντίθεση με την φαινομενική μοριακή μάζα περίπου 190 kDa που παρατηρήθηκε για την ADAMTS13 η οποία υπέστη διαδικασία καθαρισμού από ανθρώπινο πλάσμα. Αυτή η διαφορά υπολογισμένης έναντι παρατηρούμενης μοριακής μάζας πιθανότατα οφείλεται στην γλυκοζυλίωση. Η ADAMTS13 συντίθεται κυρίως στο ήπαρ, μολονότι έχει παρατηρηθεί μεταβλητή έκφραση σε άλλους ιστούς και κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων. (Levy et al., 2005)

1.5 Χρωμοσωμική θέση της ADAMTS13

Κυτταρογενετική θέση: 9q34.2, που αντιστοιχεί στον μακρύ (q) βραχίονα του χρωμοσώματος 9 στη θέση 34.2 (Εικόνα 3.).



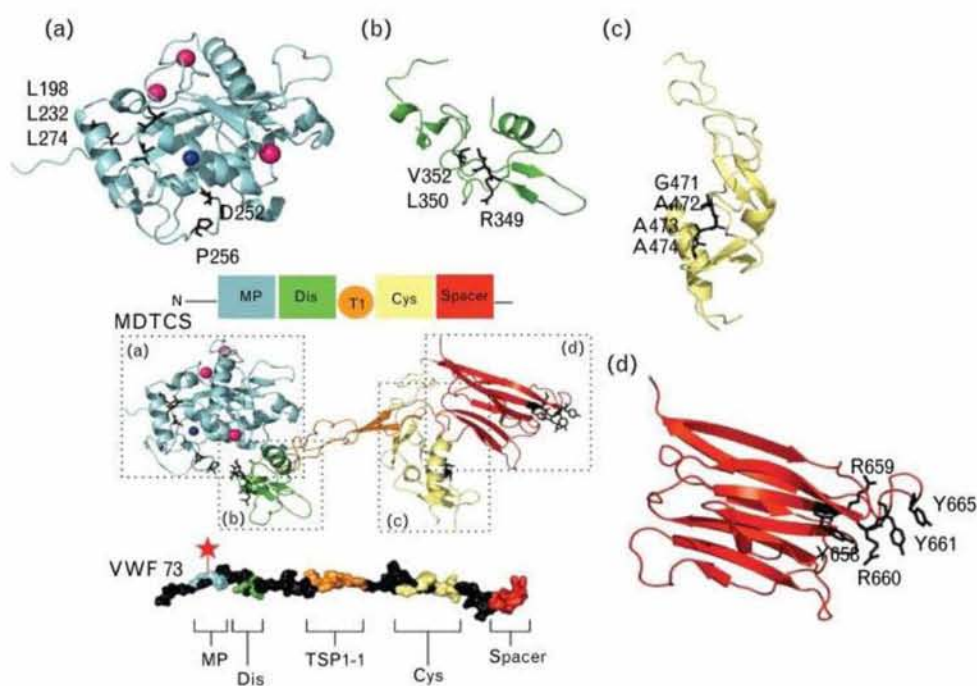
Εικόνα 3. : Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου της ADAMTS13 (Lister Hill, 2018)

Μοριακή θέση: ζεύγη βάσεων 133.414.339 έως 133.459.403 στο χρωμόσωμα 9 (Homo sapiens Release Note 108, GRCh38.p7) (NCBI), (Lister, 2018)

1.6 Δραστικότητα της ADAMTS13

Η ADAMTS13 χαρακτηρίζεται από την άκρως συντηρημένη αλληλουχία δέσμευσης ψευδαργύρου (HEXXHXXGXXHD). Όταν αυτή η αλληλουχία δέσμευσης ψευδαργύρου απουσιάζει, η πρωτεΐνη δεν έχει πρωτεολυτική δραστικότητα. Αυτή η καταλυτική θέση χαρακτηρίζεται περαιτέρω από ένα διατηρημένο κατάλοιπο μεθειονίνης. Αυτό το «Metturn» δημιουργεί μια σφικτή στροφή, σημαντική για τη δομή της ενεργού θέσης, η οποία πιθανώς ενεργεί ως μια υδρόφοβη βάση κάτω από το ιόν ψευδαργύρου. Μεταξύ αυτής της διατηρημένης μεθειονίνης και της καταλυτικής θέσης, υπάρχει επίσης ένα καλά διατηρημένο κατάλοιπο κυστεΐνης άγνωστης λειτουργίας. Τα κατάλοιπα σύνδεσης ψευδαργύρου και ασβεστίου ελέγχουν τη δραστηριότητα διάσπασης της ADAMTS13. Η δραστικότητα ADAMTS13 περιλαμβάνει τη δέσμευση κατιόντος ψευδαργύρου και τριών ιόντων ασβεστίου. Η δέσμευση ασβεστίου στις τρεις θέσεις πρόσδεσης ασβεστίου (Asp182, Asp187 και Glu212) είναι απαραίτητη για τη δομική ακεραιότητα της πρωτεολυτικής θέσης. Ένα μόριο νερού, πολωμένο με Glu225, είναι μέρος της διατηρούμενης αλληλουχίας δέσμευσης ψευδαργύρου και σταθεροποιείται από το ιόν ψευδαργύρου. Το μόριο υδροξειδίου που δημιουργείται από το μόριο του νερού υποτίθεται ότι προσβάλλει την καρβονυλική ομάδα σκελετού μεταξύ των καταλοίπων Tyr1605-Met1606 επιτρέποντας την υδρόλυση αυτού του δεσμού. (Catherine et al., 2015)

Η περιοχή μεταλλοπρωτεάσης μόνη της δεν έχει την ικανότητα να δεσμεύεται με εξειδίκευση στον VWF ή να διασπάται στη θέση διάσπασης Tyr1605-Met1606 του VWF. Οι μη καταλυτικές περιοχές είναι απαραίτητες για την εξειδίκευση του υποστρώματος. Ωστόσο, μόνο η μεταλλοπρωτεάση εμφανίζει δραστικότητα διάσπασης αλλά σε μη ειδική θέση VWF μετά 16-24h επώασης (Ai et al., 2005). Εντός της περιοχής μεταλλοπρωτεάσης, τα κατάλοιπα Asp252 και Pro256 αλληλεπιδρούν με Met1606, ένα κατάλοιπο στην θέση διάσπασης του VWF. Επίσης απαραίτητη για τη δραστικότητα πρωτεάσης της μεταλλοπρωτεάσης είναι η παρουσία πολλών υδρόφοβων καταλοίπων μαζί στην ADAMTS13 για δέσμευση στον VWF. Επιπλέον, το κατάλοιπο Leu1603 στον VWF, όταν έχει τροποποιηθεί έχει μεγαλύτερη αρνητική επίδραση (περισσότερο από 100 φορές μείωση δραστικότητας) από οποιοδήποτε άλλο κατάλοιπο της θέσης διάσπασης. Προτείνεται ότι το κατάλοιπο Leu1603 αλληλεπιδρά με κατάλοιπα κοντά στο ιόν ψευδαργύρου επιτρέποντας την σωστή διάσπαση του δεσμού Tyr1605-Met1606 (Xiang et al., 2011) (Εικόνα 4.).



Εικόνα 4. : Ο παράγοντας von Willebrand 73 έχει θέση σύνδεσης για ADAMTS13 και MDTCS. Μια έγχρωμη απεικόνιση των σημασμένων περιοχών με MDTCS είναι ένα μοντέλο ομολογίας (M) και μια μερική κρυσταλλική δομή (DTCs) που δείχνει τις περιοχές δέσμευσης εντός του MDTCS. Παρακάτω, εμφανίζεται μια αναπαράσταση του VWF73 με χρώματα στην αντίστοιχη περιοχή στην MDTCS. Το κόκκινο αστέρι προσδιορίζει τη θέση διάσπασης στον VWF73. (α) Ο τομέας μεταλλοπρωτεάσης, με τα δεσμευτικά ή ενεργά κατάλοιπα να σημειώνονται ως μαύρα ραβδιά. (β) Η περιοχή disintegrin με κατάλοιπα δέσμευσης VWF που παρουσιάζονται ως μαύρα ραβδιά. (γ) Η πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή παρουσιάζεται με υδρόφοβα κατάλοιπα σύνδεσης ως μαύρα ραβδιά. (δ) η περιοχή αποστάτη παρουσιάζεται με κατάλοιπα πρόσδεσης VWF που παρουσιάζονται ως μαύρα ραβδιά. MDTCS, περιοχή μεταλλοπρωτεάσης, περιοχή όμοια με disintegrin, μοτίβο θρομβοσπονδίνης τύπου 1, περιοχή πλούσια σε cys, περιοχή αποστάτη. (Catherine et al., 2015)

Η δεύτερη περιοχή στην ADAMTS13 είναι η περιοχή που μοιάζει με disintegrin. Ονομάζεται έτσι λόγω της ομοιότητας της αλληλουχίας με τις disintegrins στο δηλητήριο φιδιού. Η περιοχή disintegrin στην ADAMTS13 στερείται των επαναλήψεων κυστεΐνης ή του μοτίβου RGD (αργινίνη, γλυκίνη, ασπαραγίνη). Η περιοχή μεταλλοπρωτεάσης και η περιοχή disintegrin συνδέονται λειτουργικά. Με την προσθήκη αυτής της σύντομης περιοχής disintegrin, αποκαθίσταται η εξειδίκευση δέσμευσης του πλήρους υποστρώματος 77 αμινοξέων στην περιοχή μεταλλοπρωτεάσης. Επίσης, παρά τη χαμηλή σχετική απόδοση, η συγκεκριμένη πρωτεολυτική δραστηριότητα αποκαθίσταται στη θέση διάσπασης. Σε αντίθεση με την περιοχή μεταλλοπρωτεάσης, είναι διαθέσιμη μια κρυσταλλική δομή για την περιοχή disintegrin καθώς και τις ακόλουθες περιοχές στην απομακρυσμένη περιοχή. Υπάρχει μικρή δευτερεύουσα δομή που έχει ως εξής: δύο αντιπαράλληλα β-φύλλα, μία μόνο N -τελική α-έλικα και τέσσερις δισουλφιδικές γέφυρες. Αυτές οι δισουλφιδικές γέφυρες διατηρούν τη δομή αυτής της επικράτειας. Η γέφυρα δισουλφιδίου Cys322-Cys347 είναι καλά συντηρημένη σε άλλες κρυσταλλωμένες πρωτεάσες ADAM (Catherine et al., 2015). Σε αυτή την επικράτεια, τα υδρόφοβα κατάλοιπα και το ένα φορτισμένο κατάλοιπο έχουν ταυτοποιηθεί ότι δεσμεύονται με VWF. Οι υποκαταστάσεις γλυκίνης σε Val352 και Leu350 παράγουν, αντίστοιχα, μία τετραπλάσια και πενταπλάσια και 10/20πλάσια μείωση στην καταλυτική

αποτελεσματικότητα στη διάσπαση σε VWF115. Παρομοίως, μία μετάλλαξη υποκατάστασης αλανίνης που εισήχθη μέσα στο κατάλοιπο Arg349 μείωσε την καταλυτική αποτελεσματικότητα της διάσπασης του VWF115 κατά 20 φορές (Groot et al., 2009). Τα κατάλοιπα βαλίνης και λευκίνης υποτίθεται ότι αλληλεπιδρούν με υδρόφοβο τρόπο και αργινίνη αλληλεπιδρά ιοντικά με Ala1612 και Asp1614 σε VWF, αντίστοιχα (Εικόνα 4b).

Η τρίτη περιοχή στην ADAMTS13 είναι η πρώτη επανάληψη TSP-1. Αυτή η κεντρική TSP-1 επανάληψη είναι πολύ καλά διατηρημένη μεταξύ των πρωτεασών οικογένειας ADAMTS. Η περιοχή έχει μόνο τρεις αντιπαράλληλους κλώνους, δύο από τους οποίους είναι β-φύλλα, και ολόκληρο το πεδίο καλύπτεται από δισουλφιδικούς δεσμούς σε κάθε άκρο. Οι κλώνοι αυτοί σταθεροποιούνται από έναν πυρήνα με CWR (κυστεΐνη, τρυπτοφάνη και αργινίνη). Η περιοχή TSP-1 εμπλέκεται στην αναγνώριση υποστρώματος. (Catherine et al., 2015)

Η πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή και η περιοχή disintegrin είναι δομικά παρόμοιες, παρά την χαμηλή ταυτότητα ακολουθίας (17%). Η πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή έχει μόνο μία βραχεία α-έλικα και δύο ζεύγη διπλών αντιπαράλληλων β-φύλλων και η δομή σταθεροποιείται με έξι δισουλφιδικούς δεσμούς (Akiyama et al., 2009). Πρόσφατα τα κατάλοιπα Gly471-Val474 στη βάση του μεταβλητού βρόχου εντός της πλούσιας σε κυστεΐνη περιοχής ταυτοποιήθηκαν για να σχηματίσουν ένα υδρόφοβο θύλακα που φαίνεται να εμπλέκεται στη δέσμευση υδρόφοβων καταλοίπων Ile1642, Trp1644, Ile1649, Leu1650 και Ile1651 σε VWF (Εικόνα 4c) και διαπιστώθηκε ότι η 75-200 φορές μείωση στην πρωτεόλυση συμβαίνει εν μέρει λόγω της απουσίας αυτών των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων από την πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι οι περιοχές που διατηρούνται διαδοχικά εντός της οικογένειας ADAMTS στην πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή δεν είναι απαραίτητες για τη δέσμευση του υποστρώματος. (Catherine et al., 2015)

Η περιοχή της ADAMTS13 με την υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης για τη θέση A2 του VWF είναι η περιοχή αποστάτη (spacer). Ο μηχανισμός της εκτυλίξεως του VWF προβλέπει ότι το exosite που δεσμεύεται στην περιοχή αποστάτη είναι το πρώτο που εκτίθεται. Αυτό μπορεί να επιτρέψει στην περιοχή αποστάτη να αναγνωρίσει το exosite του VWF, ακόμα και όταν ο VWF είναι μόνο μερικώς ξετυλιγμένος. Η περιοχή αποστάτη και η περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη λειτουργούν σχεδόν μαζί. Ένας περιέχων Leu621-Asp632 βρόγχος στην περιοχή αποστάτη έχει άμεση επαφή με το εγγύς τμήμα της πλούσιας σε κυστεΐνη περιοχής. Η περιοχή αποστάτη αποτελείται από 10 β-φύλλα που σχηματίζουν μια τοπολογία ξελαρόλιθου (Akiyama et al., 2009). Αυτό δημιουργεί ένα υδρόφοβο σύμπλεγμα που περιβάλλεται από υπολείμματα αργινίνης που προβλέπεται ότι αλληλεπιδρούν με Asp1596-Arg1659 στον VWF (Εικόνα 4d). Όταν η ADAMTS13 κόβεται πριν από την περιοχή αποστάτη (π.χ. κατασκευάσμα MDTC), υπάρχει μία τετραπλάσια μείωση του KD για το πεπτίδιο VWF73. Επιπρόσθετα, η πρωτεολυτική αποτελεσματικότητα του θραύσματος MDTC μειώνεται κατά 20 φορές (Gao et al., 2009). Οι δομικές προβλέψεις της αργινίνης που περιβάλλεται από υδρόφοβες ομάδες έχουν επιβεβαιωθεί από διάφορες λειτουργικές μελέτες. Arg660, Tyr661 και Tyr665 είναι

απαραίτητα για τη δέσμευση και τη διάσπαση του VWF. Αυτά τα τρία κατάλοιπα επίσης βρίσκονται πολύ συχνά στη θέση επιτόπου των αντισωμάτων ADAMTS13 (Pos et al., 2010; Jin et al., 2010).

Αν και η επανάληψη TSP-1 μεταξύ των περιοχών πλούσιων σε disintegrin και κυστεΐνη είναι καλά συντηρημένη μέσα στις πρωτεάσες ADAMTS, η διάταξη και ο αριθμός των επαναλήψεων TSP-1 μετά την περιοχή αποστάτη ποικίλει. Σε αντίθεση με την επανάληψη TSP1-1 που προηγείται του αποστάτη, οι αλληλουχίες άλλων επαναλήψεων TSP-1 δεν είναι καλά διατηρημένες. Επίσης, η τέταρτη από αυτές τις επαναλήψεις TSP-1 έχει δύο κυστεΐνες που προβλέπεται να είναι μη συζευγμένες. Οι πολλαπλές επαναλήψεις TSP-1 περιέχουν ένα μοτίβο CSVSCG (κυστεΐνη, σερίνη, βαλίνη, σερίνη, κυστεΐνη, γλυκίνη). Η δεύτερη σερίνη σε αυτό το μοτίβο γλυκοζυλιώνεται από διαθέσιμο οξυγόνο πλευρικής αλυσίδας και το μοτίβο CSVSCG μπορεί να δεσμεύσει τον υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας CD36 (Crawley et al., 2011).

Η ADAMTS13 είναι η μόνη γνωστή πρωτεάση ADAMTS που έχει δύο περιοχές CUB στο απομακρυσμένο C-τελικό άκρο. Η ομώνυμη πρωτεΐνη εμπλέκεται στην αναπτυξιακή ρύθμιση. Ωστόσο, η απουσία των πεδίων TSP-1 2-8 και CUB δεν έχει αρνητική επίδραση στη λειτουργία πρωτεάσης της ADAMTS13 για VWF73 ή VWF115, αλλά οι C-τελικές περιοχές είναι απαραίτητες για τη δέσμευση σφαιρικού VWF και VWF σε συνθήκες διάτμησης. (Zanardelli et al., 2009) Όταν οι επαναλήψεις TSP-1 2-8 και οι τομείς CUB περικλύπτονται, οι υπόλοιποι τομείς (δηλ. MDTCS) εξακολουθούν να διασπούν τα υποστρώματα VWF. Στην πραγματικότητα, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι είναι δυνατόν να διασπαστούν MDTCS VWF73 με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (~ 2-φορές) από ό, τι πλήρους μήκους ADAMTS13. Οι τομείς CUB δεν έχουν μετρήσιμη συγγένεια για το VWF. Εν τούτοις, παρουσία διατμητικής τάσης, το πεπτίδιο CUB1 θα αναστέλλει την πρωτεόλυση του VWF. (Zhang et al., 2007)

Οι περιοχές CUB έχουν αρνητική ρυθμιστική λειτουργία της δραστηριότητας της ADAMTS13. Έχει βρεθεί ότι όταν τα C-τελικά τμήματα της ADAMTS13 δεν δεσμεύονται σε VWF, οι TSP-1 2-8 επαναλήψεις διπλώνουν τις περιοχές CUB προς την περιοχή αποστάτη. Η απομάκρυνση αυτών των περιοχών CUB, η οποία δεν επιτρέπει την αλληλεπίδραση των περιοχών CUB με την περιοχή αποστάτη, θα παρείχε μεγαλύτερη πρόσβαση στον VWF (Catherine et al., 2015).

Οι C-τελικές περιοχές της ADAMTS13 μπορεί να έχουν ρυθμιστικές λειτουργίες εντελώς άσχετες με την πρωτεολυτική δραστηριότητα. Πέντε ομάδες θειόλης εντός των επαναλήψεων TSP-1 2-8 και της περιοχής CUB-1 δυνητικά σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς με τον VWF που αγκυρώνει το ένζυμο σε VWF πλήρους μήκους. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις δισουλφιδίου μεταξύ ADAMTS13 και πλήρους μήκους VWF, καθώς και τα συμπλέγματα ADAMTS13-VWF, δεν έχουν περιγραφεί πλήρως (Banno et al., 2010). Εντούτοις, αυτές οι ελεύθερες αλληλεπιδράσεις θειόλης των απομακρυσμένων περιοχών φαίνονται να έχουν αντιθρομβωτική δραστηριότητα ανεξάρτητα από τις πρωτεολυτικές λειτουργίες της ADAMTS13. Περαιτέρω, έχει αποδειχθεί ότι τα ποντίκια

που δεν έχουν περιοχές TSP-1 7-8 και CUB είναι πιο θρομβογόνα σε συνθήκες υψηλής διάτμησης (Yeh et al., 2009).

1.7 Βιοσύνθεση της ADAMTS13

Οι συγκεντρώσεις της ADAMTS13 στο ανθρώπινο πλάσμα είναι 0,7-1,4 µg / ml (3,5-7,0 nM) (Rieger et al., 2006).

- Ήπαρ

Η ADAMTS13 συντίθεται πρωτίστως στο ήπαρ, και αυτό αποδεικνύεται με in situ υβριδισμό και ανοσοϊστοχημεία. Το ανθρώπινο ADAMTS13 mRNA και η πρωτεΐνη εντοπίζονται αποκλειστικά σε ηπατικά κύτταρα stellate (HSCs), τα οποία βρίσκονται στο διάμεσο διάστημα μεταξύ ηπατοκυττάρων (Uemura et al., 2005). Επίσης, απομονώθηκαν HSC από ποντικούς και από αρουραίους που εκκρίνουν μια πρωτεΐνη ~ 195 kDa ADAMTS13, η οποία είναι πρωτεολυτικά δραστική στην διάσπαση του πολυμερικού VWF και των πεπτιδυλο παραγώγων αυτού (Zhou et al., 2005; Niiya et al., 2006).

Η έκφραση της ADAMTS13 σε HSCs αρουραίου αυξάνεται ως συνάρτηση του χρόνου καλλιέργειας κατά τον οποίο ενεργοποιούνται τα κύτταρα, όπως αποδεικνύεται με συν-έκφραση της α- ακτίνης λείων μυών. Ο ρυθμός της σύνθεσης ADAMTS13 με HSC αυξάνεται επίσης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση τετραχλωράνθρακα (Niiya et al., 2006) και μετά από σύνδεση αγωγού της χολής, η οποία ενεργοποιεί HSCs in vivo (Watanabe et al., 2006).

Αντιστρόφως, το αντιγόνο και η δραστικότητα της ADAMTS13 του πλάσματος μειώνεται σημαντικά σε αρουραίους που υποβλήθηκαν σε αγωγή με διμεθυλο νιτροζαμίνη, η οποία προκαλεί απόπτωση HSC. Επίσης μείωση δραστικότητας ADAMTS13 παρατηρήθηκε και μετά από μερική ηπατεκτομή, η οποία μειώνει τον αριθμό των λειτουργικών HSCs (Kume et al., 2007).

Επομένως, τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα HSCs είναι η κύρια πηγή ADAMTS13 του πλάσματος σε θηλαστικά (Zheng, 2015).

- Αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, μεγακαρυοκύτταρα και αιμοπετάλια, σπειραματικά υποκυτταρικά και γλοιακά κύτταρα

Η ADAMTS13 παράγεται επίσης σε περιορισμένες ποσότητες από αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, μεγακαρυοκύτταρα και αιμοπετάλια, σπειραματικά υποκυτταρικά και γλοιακά κύτταρα, παρόλο που η φυσιολογική σημασία αυτών των πηγών δεν έχει καθοριστεί ακόμη.

Λαμβάνοντας υπόψη την μαζική κάλυψη της επιφάνειάς τους, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να συμβάλλουν σημαντικά στα επίπεδα πλάσματος της ADAMTS13. Σε καλλιέργεια, η σύνθεση ADAMTS13 από ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας και HSCs αρουραίου αναστέλλεται δραματικά από φλεγμονώδεις κυτοκίνες,

συμπεριλαμβανομένης της ιντερφερόνης- γ (INF γ), του παράγοντα νέκρωσης όγκων- α (TNF α) και της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), οι οποίες απελευθερώνονται μεταβλητά κατά τη διάρκεια της συστηματικής φλεγμονής και των οξέων επεισοδίων του TTP (Shang et al., 2006).

Τα αιμοπετάλια στοχεύουν ειδικά σε περιοχές αγγειακού τραυματισμού όπου ενεργοποιούνται και αποκοκκοποιούνται, απελευθερώνοντας τα κοκκώδη περιεχόμενα τους (συμπεριλαμβανομένου του VWF), τα οποία είναι προθρομβωτικά και προφλεγμονώδη. Επομένως, η ταυτόχρονη τοπική απελευθέρωση ακόμη και μικρών ποσοτήτων δραστικής πρωτεάσης ADAMTS13 μπορεί να έχει βαθιές ανασταλτικές επιδράσεις στη θρόμβωση και τη φλεγμονή (Suzuki et al., 2004).

Στα ποδοκύτταρα, οι IL-4 και IL-6 ρυθμίζουν διαφορετικά το mRNA της ADAMTS13 και την πρωτεΐνη, η οποία αντιστρέφεται με σιμβαστατίνη, έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο αντι-αθηροσκληρωτικό παράγοντα (Kristoffersson et al., 2007).

Στα γλοιακά κύτταρα (αστροκύτταρα και μικρογλοία), η έκφραση ADAMTS13 ρυθμίζεται σημαντικά μετά από βλάβη του νωτιαίου μυελού, υποδεικνύοντας έναν πιθανό ρόλο της ADAMTS13 στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Tauchi et al., 2012).

Η ρύθμιση των επιπέδων της ADAMTS13 του πλάσματος υπό φυσιολογικές συνθήκες παραμένει ελάχιστα κατανοητή. Στον άνθρωπο, ο VWF φαίνεται να είναι ο κύριος ρυθμιστής. Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο ο VWF ρυθμίζει τις συγκεντρώσεις ADAMTS13 στο πλάσμα δεν είναι γνωστός, πιθανολογείται ότι περιλαμβάνει κατανάλωση. Τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα μέχρι σήμερα δείχνουν ότι οι συγκεντρώσεις ADAMTS13 του πλάσματος ρυθμίζονται σε μεταγραφικά και μεταμεταφραστικά επίπεδα κάτω από ποικίλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις μέσω μηχανισμών που δεν έχουν διευκρινιστεί λεπτομερώς (X. Long Zheng, 2015).

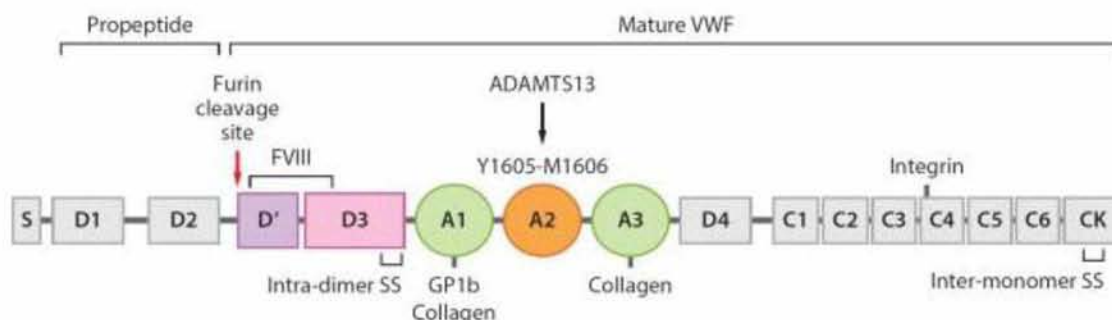
1.8 Παράγοντας von Willebrand (VWF)

Ο VWF, μια άφθονη γλυκοπρωτεΐνη πλάσματος, χρησιμεύει ως ο πρωταρχικός συγκολλητικός σύνδεσμος μεταξύ των αιμοπεταλίων και του υποενδοθηλίου και επίσης φέρει και σταθεροποιεί τον παράγοντα πήξης VIII (FVIII) στην κυκλοφορία.

Ο VWF συντίθεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και μεγακαρυοκύτταρα ως πρόδρομο μόριο που περιέχει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο και ένα μεγάλο προπεπτίδιο (Wagner et al., 1983) (Εικόνα 5).

Στο ενδοθηλιακό κύτταρο ο VWF εκκρίνεται μέσω τόσο των βασικών όσο και των ρυθμιζόμενων οδών (Wagner et al., 1989). Ο VWF που μεταφέρεται μέσω της ρυθμιζόμενης διαδρομής αποθηκεύεται για πρώτη φορά σε ένα μοναδικό κοκκίο αποθήκευσης που ονομάζεται σώμα Weibel-Palade (Wagner et al., 1993). Ως απόκριση σε μια ποικιλία ερεθισμάτων, ο VWF απελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα με τη μορφή μεγάλων πολυμερών (UL-VWF), τα οποία μπορούν να φτάσουν περίπου στα 20.000 kDa και να είναι η πλέον δραστική μορφή του VWF (Tsai et al., 1989; Ruggeri et

al., 1981). Ο VWF της κυκλοφορίας όπως αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) είναι ώριμο μονομερές VWF (~300 kDa), καθώς περιέχει και αρκετά μικρότερα θραύσματα (Tsai et al., 1991). Δύο από αυτές τις μικρότερες μορφές (τα θραύσματα των 176 kDa και 140 kDa) έχουνδειχθεί με ανάλυση αλληλουχίας αμινοξέων ότι είναι τα προϊόντα διάσπασης της ακέραιης υπομονάδας VWF στον δεσμό μεταξύ τυροσίνης 1605 και μεθειονίνης 1606 (Dent et al., 1990) (Εικόνα 5.).

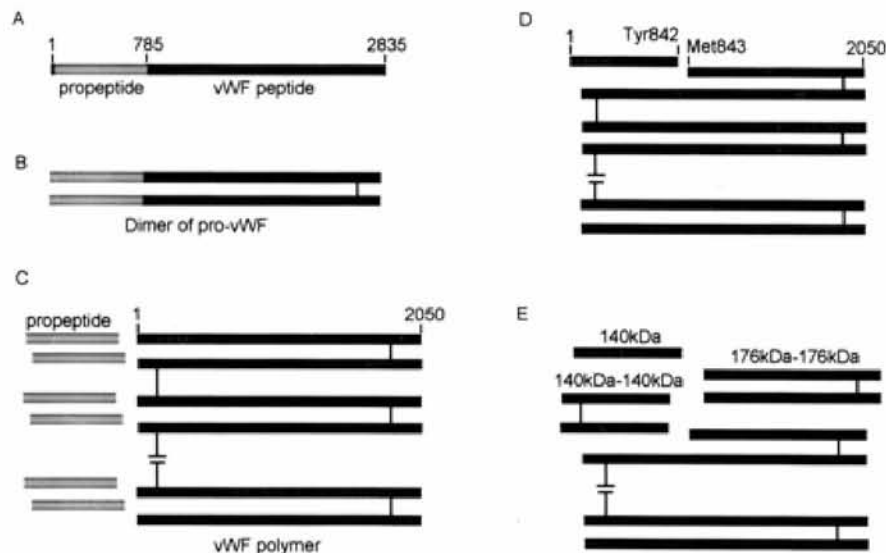


Εικόνα 5. : Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης επικράτειας pro-VWF, πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με VWF και τη θέση διάσπασης ADAMTS13. Το μεγάλο προπεπτίδιο (D1-D2) σε pro-VWF διασπάται με φουρίνη για να παραχθεί η ώριμη υπομονάδα VWF, η οποία περιλαμβάνει επικράτειες δέσμευσης FVIII (D'-D3), GP1b- (A1) και δεσμευτικές περιοχές κολλαγόνου (A3) και μια κεντρική περιοχή A2 που περιέχει τη θέση διάσπασης από ADAMTS13, καθώς και αρκετές C-τελικές περιοχές (D4-CK) οι οποίες δεσμεύουν ιντεγρίνη αIIbβ3. (Zheng, 2015)

Ο VWF των αιμοπεταλίων βρίσκεται σε μορφή υψηλού μοριακού βάρους που στερείται N-συνδεδεμένης σιαλυλίωσης και είναι σχετικά ανθεκτικός στην πρωτεόλυση από την ADAMTS13 (McGrath et al., 2013). Καθώς τα αιμοπετάλια κατευθύνονται απευθείας στις θέσεις αγγειακής βλάβης, όπου υποβάλλονται σε αποκοκκίωση και απελευθέρωση του περιεχομένου τους, η τοπική χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων VWF αιμοπεταλίων ανθεκτικών σε ADAMTS13 μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στην αιμόσταση. Σύμφωνα με αυτή την ιδέα, η αποθήκευση των αιμοπεταλίων του VWF μειώνεται σε αιμορραγικές διαταραχές, όπως η νόσος von Willebrand και η βασική θρομβοκυτταραιμία (Zheng, 2015).

1.9 Διάσπαση του VWF από την ADAMTS13

Μετά την έκκριση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο vWF διασπάται από την ADAMTS13 στην κυκλοφορία σε μια σειρά πολυμερών (Εικόνα 6D και 6E). Αυτή η πρωτεάση, η οποία απαιτεί ιόντα ασβεστίου ή ψευδαργύρου για δραστηριότητα, διασπά τον Tyr842-Met843 δεσμό στην κεντρική περιοχή A2 του ώριμου πολυπεπτιδίου vWF. Η διάσπαση του vWF εξηγεί γιατί υπάρχουν στο πολυμερές του vWF 2 μορφολογικά διαφορετικοί τύποι των άκρων (Tsai., 2003).



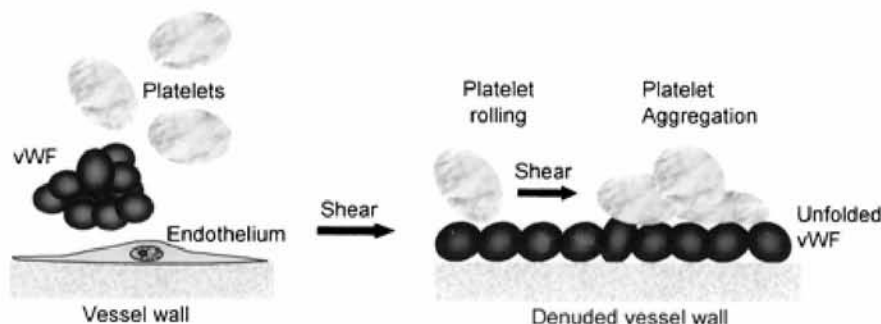
Εικόνα 6: Σχήμα που δείχνει την πρωτεόλυση του VWF και την παραγωγή πολυμερών. **A.** Ο νεοσυντιθέμενος VWF αποτελείται από ένα πεπτιδίο σήματος (22 κατάλοιπα), ένα προπεπτίδιο (763 κατάλοιπα) και ένα ώριμο πολυπεπτίδιο (2050 κατάλοιπα). **B.** στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ο pro-VWF σχηματίζει ένα διμερές με δεσμό δισουλφιδίου στο καρβοξυτελικό άκρο. **C.** στο σώμα Weibel-Palade, στα κοκκία αποθήκευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, ο VWF σχηματίζει ένα τεράστιο πολυμερές καθώς το προπεπτίδιο διασπάται. **D.** Στην κυκλοφορία, ο VWF διασπάται από την ADAMTS13 στον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ της τυροσίνης842 και της μεθειονίνης843. **E.** Η επανειλημμένη διάσπαση τελικά μετατρέπει τον VWF σε μια σειρά πολυμερών, ενώ παράγονται διμερή των 176 kDa και των 140 kDa. Οι προσδιορισμοί της δραστηριότητας ADAMTS13 βασίζονται σε μείωση του μεγέθους του πολυμερούς VWF ή τη δημιουργία πρωτεολυτικών θραυσμάτων. Επειδή η προσρόφηση, η αναγωγή δισουλφιδίου, και η διάσπαση από την πλασμίνη ή άλλες πρωτεάσες μειώνουν επίσης το μέγεθος του VWF, δοκιμασία που βασίζεται σε μεταβολή του μεγέθους VWF θα παράγει περιστασιακά εσφαλμένες τιμές της δραστηριότητας ADAMTS13. (Tsai., 2003)

1.10 Αλληλεπίδραση ADAMTS13 με τον VWF

Η σύνδεση της γλυκοπρωτεΐνης 1b των αιμοπεταλίων (GP1b) και/ή του παράγοντα πήξης VIII (FVIII) με τον διαλυτό VWF αυξάνει δραματικά τον ρυθμό της πρωτεόλυσης από την ADAMTS13 υπό διάτμηση. Αυτή η επίδραση εξαιρείται σε μεγάλο βαθμό όταν ο VWF προμετουσιωθεί με ουρία 1,5 M. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η επίδραση αύξησης του ρυθμού των GP1b και FVIII στην πρωτεόλυση του VWF πιθανώς προκαλείται από την αλλοίωση των αλληλεπιδράσεων 'επικράτεια-επικράτεια' και την αποσταθεροποίηση της περιοχής VWF-A2 όπου βρίσκεται η θέση διάσπασης (Skipwith et al., 2010; Cao et al., 2008).

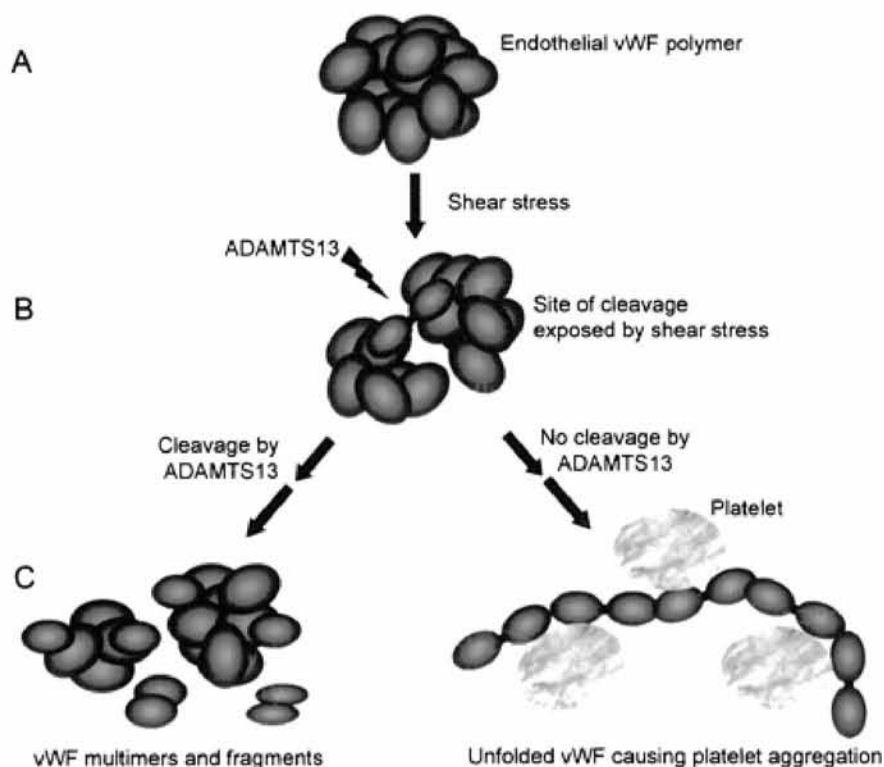
Τα μεγάλα πολυμερή VWF είναι πιο ικανά να υποστηρίξουν την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, επειδή η ευελιξία διαμόρφωσής τους τους επιτρέπει να ξεδιπλωθούν υπό συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης. Ο ξεδιπλωμένος VWF παρέχει ένα υπόστρωμα στις θέσεις βλάβης του αγγείου για την υποστήριξη της κίνησης (rolling) και της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων. Για την υποστήριξη αυτής της υπόθεσης, η σύντομη έκθεση του μεγάλου VWF σε διατμητική τάση αυξάνει την ικανότητά του για υποστήριξη της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων. Αντιθέτως, το ίδιο επίπεδο διατμητικής τάσης δεν αυξάνει την συσσωμάτωση αιμοπεταλίων υποστηριζόμενη από μικρά πολυμερή. Μαζί, αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι υπό στατικές συνθήκες, ο

VWF δεν είναι προσβάσιμος στη δέσμευση από υποδοχείς αιμοπεταλίων. Η διατμητική τάση εκθέτει τις θέσεις πρόσδεσης στον VWF, διευκολύνοντας έτσι τη δέσμευση VWF-αιμοπεταλίων. Η ανταπόκριση του μεγάλου VWF στο διατμητικό στρες εξηγεί γιατί τα μεγάλα πολυμερή είναι πιο αποτελεσματικά από τα μικρά πολυμερή στην υποστήριξη της συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων και γιατί η μεσολαβούμενη από VWF συσσωμάτωση αιμοπεταλίων αυξάνεται από τα υψηλά επίπεδα διατμητικής τάσης (Tsai, 2003) (Εικόνα 7.).



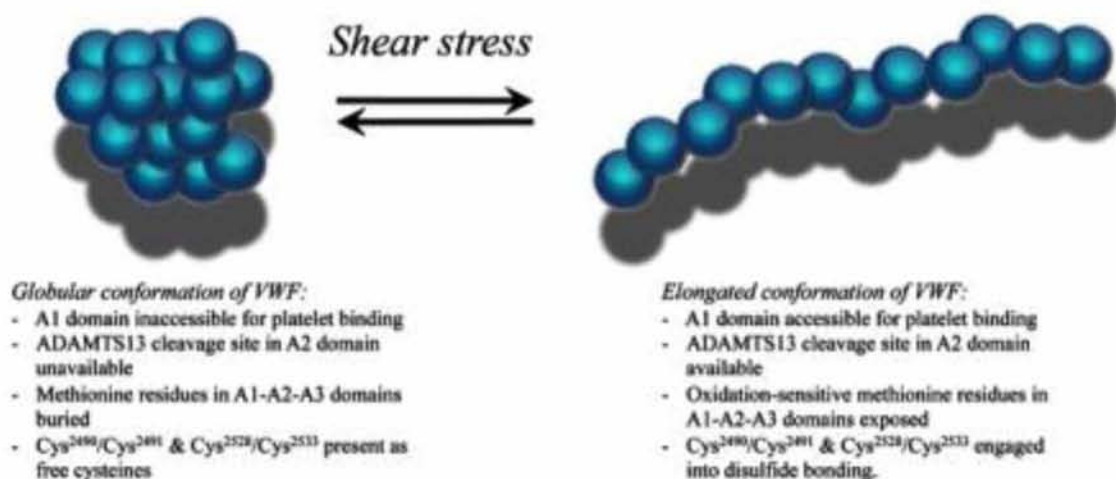
Εικόνα 7. : Σχήμα που δείχνει πως η τάση διατμήσεως μπορεί να προάγει τη μεσολαβούμενη από VWF συσσωμάτωση αιμοπεταλίων σε θέσεις βλάβης αγγείων. Ένα μεγάλο πολυμερές VWF δεσμεύεται και εκτυλίσσεται στην επιφάνεια του τραυματισμένου τοιχώματος του αγγείου κατά μήκος της κατεύθυνσης της διατμητικής τάσης, σχηματίζοντας ένα υπόστρωμα για την κίνηση, προσκόλληση και συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. (Tsai, 2003)

Σε αυτό το μοντέλο, η εκδίπλωση με διατμητική τάση είναι απαραίτητη για τη σύνδεση VWF-αιμοπεταλίων. Ωστόσο, οι ξετυλιγμένες μορφές του VWF, εάν αφεθούν να συσσωρευτούν στην κυκλοφορία, μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο ενδοαγγειακής δέσμευσης αιμοπεταλίων-VWF, συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων και μικροαγγειακής θρόμβωσης. Η ADAMTS13, με την αποκοπή των ξεδιπλωμένων μορφών του VWF, αποτρέπει τη δέσμευση αιμοπεταλίων-VWF στην κυκλοφορία. Με βάση αυτό, προβλέπεται ότι η έλλειψη ADAMTS13 θα προκαλέσει το σχηματισμό θρόμβων που εμπλουτίζονται με VWF και αιμοπετάλια, όπως ανιχνεύονται για παράδειγμα σε ασθενείς με TTP (Tsai, 2003) (Εικόνα 8.).



Εικόνα 8. : Η ανεπάρκεια της ADAMTS13 προκαλεί θρόμβωση των αιμοπεταλίων. Το ενδοθηλιακό πολυμερές VWF (A), όταν ξετυλίγεται από υψηλά επίπεδα διατμητικής τάσης στα αρτηρίδια και στα τριχοειδή αγγεία, γίνεται ευαίσθητο στη διάσπαση από ADAMTS13 (B). Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται όταν ο VWF μεταφέρεται μέσω της μικροκυκλοφορίας, δημιουργώντας μια σειρά πολυμερών (C, αριστερά). Η ανεπάρκεια της ADAMTS13 έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του ξετυλιγμένου VWF, η οποία διευκολύνει τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και τη μικροαγγειακή θρόμβωση (C, δεξιά). Η αύξηση της διατμητικής τάσης που προκαλείται από την αγγειακή απόφραξη έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ανάπτυξη του VWF και κύκλους περαιτέρω θρόμβωσης χαρακτηριστικής της TTP (Tsai, 2003).

Η πρώτη συνάντηση μεταξύ VWF και ADAMTS13 συμβαίνει κατά την έκκριση του VWF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η διεγερόμενη από αγωνιστή έκκριση του VWF έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό σειρών VWF που αποτελούνται από πολλαπλά διμερή του VWF (Lenting et al., 2010). Υπό την επίδραση των υδροδυναμικών διατμητικών δυνάμεων, αυτές οι σειρές επιμηκύνονται κατά μήκος του αγγειακού τοιχώματος. Αυτή η επιμήκυνση της διαμόρφωσης όχι μόνο εκθέτει τη θέση δέσμευσης για τα αιμοπετάλια στην περιοχή A1 του VWF, αλλά επίσης επεκτείνει την περιοχή A2 έτσι ώστε να γίνει διαθέσιμη η θέση διάσπασης για την ADAMTS13 (Cécile et al., 2012) (Εικόνα 9.).



Εικόνα 9. : Γεγονότα που σχετίζονται με μεταβολές διαμόρφωσης που προκαλούνται από διατμητική τάση στον VWF

Ο VWF κυκλοφορεί σε σφαιρική διαμόρφωση με το σημείο δέσμευσης αιμοπεταλίων να είναι απρόσιτο. Επιπλέον, ο χώρος διάσπασης ADAMTS13 στον τομέα A2 δεν είναι διαθέσιμος. Και οι δύο παράμετροι προστατεύουν τον VWF από τις πρόωρες αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίων και την πρωτεόλυση που προκαλείται από την ADAMTS13. Η έκθεση σε αυξημένη διατμητική τάση ξεδιπλώνει την πρωτεΐνη, επιτρέποντας τη δέσμευση των αιμοπεταλίων και την πρωτεόλυση του VWF από την ADAMTS13. Επιπλέον, εκτίθενται κατάλοιπα μεθειονίνης, τα οποία είναι ευαίσθητα στην οξείδωση με ROS. Ο οξειδωμένος VWF παρουσιάζει αντίσταση έναντι της πρωτεόλυσης ADAMTS13 και της αυξημένης δέσμευσης των αιμοπεταλίων. Η σύνδεση των αιμοπεταλίων ενισχύεται περαιτέρω με το σχηματισμό νέων γεφυρών δισουλφιδίου στις περιοχές C-VWF. Η γεφύρωση δισουλφιδίου που προκαλείται από διατμητική τάση ρυθμίζεται αρνητικά από τη δραστηριότητα αναγωγάσηςθειούλης που βρίσκεται στην C-τελική περιοχή της ADAMTS13 (Cécile et al., 2012).

Η διαδικασία επιμήκυνσης που επιτρέπει τη διάσπαση από ADAMTS13 έχει απεικονιστεί λεπτομερώς, αποκαλύπτοντας ότι οι σειρές VWF επιμηκύνονται και συρρικνώνονται με τρόπο που εξαρτάται από το χρόνο και το χώρο και ότι η διάσπαση γίνεται επιλεκτικά στις θέσεις όπου ο VWF επιμηκύνεται (De Ceunynck et al., 2011). Μετά τη διάσπαση από ADAMTS, ο VWF απελευθερώνεται στην κυκλοφορία. Λόγω της πτώσης των δυνάμεων διάτμησης, ο VWF αλλάζει από μια τεντωμένη σε μια σφαιρική μορφή, στην οποία η θέση διάσπασης από την ADAMTS13 στην περιοχή A2 είναι απρόσιτη (Schneider et al., 2007). Αυτό δεν σημαίνει ότι ο VWF και η ADAMTS13 δεν μπορούν πλέον να αλληλεπιδρούν. Έχει αποδειχθεί ότι η ADAMTS13 αλληλεπιδρά με τον VWF στην κυκλοφορία. Όπως αναμένεται, αυτή η ανεξάρτητη από την διατμητική τάση αλληλεπίδραση, προχωρά ανεξάρτητα από την περιοχή A2 εμπλέκοντας όμως το C-τελικό τμήμα των υπομονάδων VWF. Οι συμπληρωματικές θέσεις αλληλεπίδρασης βρίσκονται μακριά από την καταλυτική περιοχή της ADAMTS13 και βρίσκονται στην απομακρυσμένη C-τελική περιοχή αυτού του ενζύμου. Αυτές οι C-τελικές περιοχές έχουν βρεθεί ότι έχουν και λειτουργική σημασία, καθώς οι παραλλαγές ADAMTS13 που δεν έχουν το C-τελικό τμήμα εμφανίζονται λιγότερο αποτελεσματικές στην πρωτεόλυση VWF τόσο in vitro όσο και in vivo (Lenting et al., 2010). Ωστόσο, είναι ακόμα ασαφές κατά πόσον αυτή η μειωμένη αποτελεσματικότητα σχετίζεται με μειωμένη πρωτεολυτική δραστηριότητα κολοβωμένης ADAMTS13 ή ελαττώματος

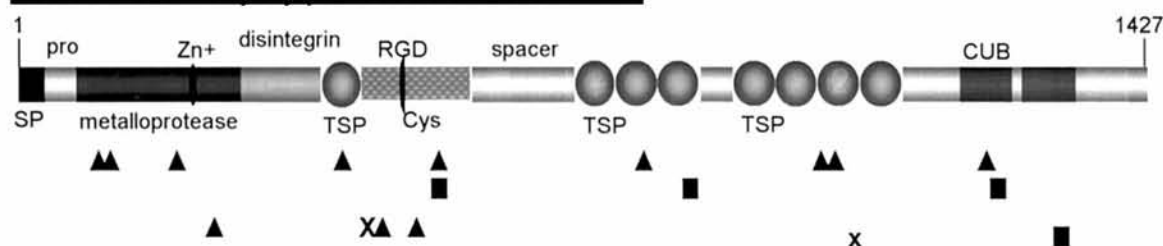
ανεξάρτητου από τη δραστηριότητα διάσπασης του VWF. Έχει αποδειχθεί ότι η έκθεση του VWF σε διατμητική καταπόνηση έχει σαν αποτέλεσμα όχι μόνο την ξεδίπλωση του μορίου, αλλά και την αναδιάταξη των δισουλφιδικών γεφυρών που συνδέουν τα C-τελικά άκρα των υπομονάδων VWF (Ganderton et al., 2007; Li et al., 2008). Μια μελέτη αποκάλυψε ότι αυτός ο ανασχηματισμός θειολικών καταλοίπων που προκαλείται από διατμητική τάση αναστέλλεται παρουσία της ADAMTS13 (Yeh et al., 2010). Στην πραγματικότητα, η C-τελική περιοχή της ADAMTS13 εμφανίζει τη δραστικότητα της αναγωγής της θειόλης προς το VWF, που αντιπροσωπεύει ένα δεύτερο μηχανισμό με τον οποίο η ADAMTS13 ρυθμίζει το μέγεθος πολυμερούς VWF.

Όπως αναφέρθηκε, τόσο η πρωτεολυτική δραστικότητα όσο και η δραστικότητα της ρεδουκτάσης της θειόλης της ADAMTS13 προς τον VWF λειτουργούν μόνο όταν ο VWF είναι στην επιμήκη του μορφή λόγω των υδροδυναμικών δυνάμεων. Είναι ενδιαφέρον ότι, κατά την επιμήκυνση, ο VWF είναι ευαίσθητος στην οξείδωση μεθειονίνης στις περιοχές A παρουσία ROS (Fu et al., 2011). Στην πραγματικότητα, επίσης η μεθειονίνη 1606 είναι ευαίσθητη στην οξείδωση, και συνεπώς ο VWF καθίσταται ανθεκτικός έναντι πρωτεόλυσης που προκαλείται από ADAMTS13.

1.11 Γενετική ανεπάρκεια της ADAMTS13

Το σύνδρομο Schulman-Upshaw είναι κληρονομική μορφή TTP με θρομβοκυτταροπενία και μικροαγγειοπαθητική αιμόλυση που εμφανίζεται σύντομα μετά τη γέννηση (Schulman et al., 1960; Upshaw et al., 1978). Δέκα περιπτώσεις με χαρακτηριστικά του συνδρόμου Schulman-Upshaw έχουν μελετηθεί γενετικά (Levy et al., 2001). Η ανάλυση αυτών των ασθενών καθώς και των μελών της οικογένειάς τους από 7 γενεαλογίες αποκαλύπτει ότι το επίπεδο πρωτεάσης ήταν $<0,1$ U/mL στους ασθενείς και μερικώς ανεπαρκείς (0,49 έως 0,68 U / mL) στους γονείς αυτών. Τα άλλα γενετικά συνδεδεμένα μέλη της οικογένειας κατανέμονται εξίσου μεταξύ φυσιολογικών (0,79 έως 1,27 U/mL) και μερικώς ανεπαρκών ομάδων. Τα μέλη της οικογένειας που δεν συνδέονται γενετικά με τους ασθενείς είχαν φυσιολογικά επίπεδα πρωτεάσης, εξαιρουμένων των περιβαλλοντικών παραγόντων ως αιτία της έλλειψης ADAMTS13. Η σοβαρή ανεπάρκεια ADAMTS13 στους ασθενείς με σύνδρομο Schulman-Upshaw επιβεβαιώθηκε από την παρουσία πολυμερών υπερευαίσθησίας VWF στο πλάσμα (Tsai, 2003) (Εικόνα 10.).

1.12 Μεταλλάξεις γονιδίου ADAMTS13



Εικόνα 10. : Αναφέρονται οι κατά προσέγγιση θέσεις των μεταλλάξεων στο γονίδιο της ADAMTS13. Μεταλλάξεις missense (*), μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου (■) και μεταλλάξεις nonsense (x) που εντοπίστηκαν σε μερικές από τις γενετικές μελέτες. (Tsai, 2003)

Δώδεκα μεταλλάξεις της ADAMTS13 έχουν ανιχνευθεί σε 14 από τα 15 αλληλόμορφα της νόσου TTP: 1 σύζευξη, 2 μετατοπίσεις πλαισίου και 9 μεταλλάξεις missense. Οι μεταλλάξεις missense βρίσκονται στην περιοχή μεταλλοπρωτεάσης (3 μεταλλάξεις), στην επανάληψη TSP1, στην πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή (1 μετάλλαξη σε κάθε μία) και σε άλλες λιγότερο συντηρημένες περιοχές (4 μεταλλάξεις) (Levy et al., 2001). Άλλες μελέτες έχουν περιγράψει επιπλέον μεταλλάξεις του γονιδίου ADAMTS13 σε ασθενείς με συγγενή TTP. Όλες μαζί, οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν μέχρι τώρα δεν αποκαλύπτουν εμφανή στοιχεία για «hot spots», αν και μια μετάλλαξη (P475S) μπορεί να είναι μια πολυμορφική παραλλαγή με μειωμένη δραστηριότητα πρωτεάσης στον ιαπωνικό πληθυσμό. Μελέτες έκφρασης αποκαλύπτουν ότι οι μεταλλάξεις καταργούν τη δραστηριότητα πρωτεάσης ή βλάπτουν την έκκριση της. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι πολλαπλές, φυσικά διαχωρισμένες περιοχές στην ADAMTS13 εμπλέκονται στην έκφραση της ενζυμικής δραστηριότητας (Kokame et al., 2002). Αρχικά, δεν ανιχνεύθηκαν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις εκτός από 1 γενεαλογία, στην οποία και οι 3 περιπτώσεις είναι ομόζυγες για μία μόνο μετάλλαξη. Οι γονείς αυτών των 3 περιπτώσεων προέρχονται από την ίδια πόλη και μπορεί να έχουν και κοινή καταγωγή. Η παρουσία πολλαπλών μεταλλάξεων μεταξύ των ασθενών και πολλαπλών πολυμορφικών θέσεων στον πληθυσμό υποδηλώνει ότι το γονίδιο ADAMTS13 είναι επιρρεπές σε μεταλλάξεις. Τα άτομα με 2 αντίγραφα μηδενικών μεταλλάξεων είναι πιθανό να έχουν θανατηφόρα αποτελέσματα πριν ή αμέσως μετά τη γέννηση, ενώ άτομα με μεταλλάξεις που έχουν μικρότερη ή μηδενική επίδραση στη δραστηριότητα πρωτεάσης είναι πιο πιθανό να επιβιώσουν. Αυτή η διαδικασία επιλογής μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη ασθενών με 2 αντίγραφα μηδενικών μεταλλάξεων (Levy et al., 2001).

1.13 Αιμορραγία και θρόμβωση

Η αιμόσταση και η θρόμβωση αντιπροσωπεύουν δύο πλευρές του ίδιου νομίσματος. Η **αιμόσταση** διατηρεί τη ρευστότητα του αίματος στο αγγειακό σύστημα ενώ επιτρέπει τον γρήγορο σχηματισμό θρόμβων για να αποτρέψει την υπερβολική αιμορραγία μετά από τραυματισμό αιμοφόρων αγγείων. Η **θρόμβωση** είναι μια παθολογική επέκταση του φυσιολογικού αιμοστατικού μηχανισμού, που εμφανίζεται όταν αναπτύσσεται ανεπιθύμητος σχηματισμός θρόμβων σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις. Οι μοριακοί μηχανισμοί που αποτελούν τη βάση των δύο φαινομένων είναι ουσιαστικά ταυτόσημοι. Ένας από τους βασικούς παράγοντες και στις δύο διαδικασίες είναι ο παράγοντας von Willebrand, ο οποίος απεικονίζει τέλεια αυτή τη δυαδικότητα μεταξύ αιμοστατικών και θρομβωτικών μηχανισμών (Cécile et al., 2012).

Ο ρόλος του VWF είναι ιδιαίτερα σημαντικός σε υψηλές ταχύτητες διάτμησης, καθώς το VWF είναι το μόνο μόριο ικανό να προάγει την πρόσφυση των αιμοπεταλίων και τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων κατά τρόπο ανθεκτικό στις ροές σε αυτές τις συνθήκες (Reininger, 2008). Η ρύθμιση του VWF είναι υπό τον έλεγχο της ADAMTS13 που τον διασπά σε μια συγκεκριμένη θέση στην περιοχή A2 του VWF μεταξύ καταλοίπου τυροσίνης 1605 και μεθειονίνης 1606. Ο VWF είναι ένα μάλλον μοναδικό μόριο στην ικανότητά του να αλλάζει σχήμα σύμφωνα με τον τύπο ροής. Πρόσφατα έγινε έρευνα

σχετικά με το πώς το ξεδίπλωμα του VWF από την επιμήκη ροή μπορεί να ρυθμίσει τόσο το αιμοστατικό του δυναμικό όσο και τη διάσπασή του από την ADAMTS13 (Springer, 2011).

1.14 Ασθένειες και ADAMTS13

Οι ασθένειες που σχετίζονται με την ADAMTS13 καθώς και η βασική αιτία εμφάνισής τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1

Νόσος				Αιτία
Von Willebrand Disease	Type 1	(VWD1)		μερική ποσοτική ανεπάρκεια του VWF
Von Willebrand Disease	Type 2A	(VWD2A)		έλλειψη μεγάλων πολυμερών VWF λόγω μεταλλάξεων => ανεπαρκής δέσμευση αιμοπεταλίων
Von Willebrand Disease	Type 2B	(VWD2B)		απουσία πολυμερών VWF υψηλού MB λόγω αυξημένης πρωτεόλυσης από ADAMTS13 ως αποτέλεσμα μετάλλαξης
Von Willebrand Disease	Type 2M	(VWD2M)		έλλειψη ή μειωμένη συγγένεια VWF με την GpIba λόγω μεταλλάξεων
Von Willebrand Disease	Type 2N	(VWD2N)		εξασθένηση της δέσμευσης του FVIII στον VWF λόγω μεταλλάξεων
Von Willebrand Disease	Type 3	(VWD3)		ποιοτικά ελαττώματα του VWF
Acquired Von Willebrand Syndrome		(AVWS)		απώλεια μεγάλων πολυμερών VWF λόγω μειωμένης επιβίωσης μετά την έκκριση
Cardio Vascular Disease		(CVD)		αυξημένα επίπεδα VWF
Thrombotic Thrombocytopenic Purpura		(TTP)		ανεπαρκής δραστηριότητα ADAMTS13 => παρουσία πολύ μεγάλων και υπερ-ενεργών πολυμερών VWF
Systemic Lupus Erythematosus		(SLE)		Ασταθής και δυνητικά θανατηφόρα ισοροπία ADAMTS13 - VWF

- Κληρονομική νόσος von Willebrand

Η ανακάλυψη του VWF συνδέεται στενά με το ιστορικό αιμορραγικών διαταραχών. Η νόσος Von Willebrand (VWD), που εντοπίστηκε το 1926 από τον Dr. Erik von Willebrand, προκαλείται από κληρονομικές ποσοτικές ή ποιοτικές ελλείψεις στον VWF. Η ταξινόμηση του VWD βασίζεται σε παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς. (Cécile et al., 2012).

Έχουν αναγνωριστεί τρεις κύριοι τύποι, ο τύπος 1 περιλαμβάνει μερική ποσοτική ανεπάρκεια, ο τύπος 2 περιλαμβάνει ποιοτικά ελαττώματα και ο τύπος 3 αντιστοιχεί σε ποιοτικά ελαττώματα. Η VWD τύπου 2 χωρίζεται περαιτέρω σε διάφορους υποτύπους, συμπεριλαμβανομένων των τύπων 2A, 2B, 2M και 2N, κάθε ένας από τους οποίους

συνδέεται με ένα συγκεκριμένο λειτουργικό ή δομικό ελάττωμα. (Schneppenheim et al., 2011)

- Ο τύπος VWD 2A συνδέεται με την έλλειψη πολυμερών, που έχει ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή δέσμευση των αιμοπεταλίων. Η έλλειψη πολυμερών υψηλού μοριακού βάρους προέρχεται από μεταλλάξεις που επηρεάζουν τον ενδοκυτταρικό πολυμερισμό (αποκαλούμενες μεταλλάξεις τύπου 2A ομάδας 1, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή D3) ή από μεταλλάξεις που επιτρέπουν την υπερβολική πρωτεόλυση από ADAMTS13 (μεταλλάξεις ομάδας 2A ομάδας 2, το πεδίο A2). (Cécile et al., 2012)
- Ο τύπος VWD 2B αποτελείται από μεταλλάξεις gain-of-function στην περιοχή A1, αυξάνοντας όχι μόνο τη συγγένεια για τη γλυκοπρωτεΐνη υποδοχέα αιμοπεταλίων (Gp) Iba, αλλά και την ευαισθησία για πρωτεόλυση από την ADAMTS13. Η αυξημένη συνάφεια αιμοπεταλίων μπορεί να προκαλέσει θρομβοπενία, η οποία φαίνεται να είναι ο κύριος παράγοντας κινδύνου για αιμορραγία σε ασθενείς με VWD τύπου 2B. Η απουσία πολυμερών υψηλού μοριακού βάρους που παρατηρούνται σε αυτούς τους ασθενείς φαίνεται ότι είναι το αποτέλεσμα της πρωτεόλυσης που προκαλείται από ADAMTS παρά την προσρόφηση στα αιμοπετάλια. (Rayes et al., 2007)
- Οι μεταλλάξεις τύπου 2M VWD εμφανίζονται επίσης στην περιοχή A1, αλλά προκαλούν αντίθετα έλλειψη ή μειωμένη συγγένεια με την GpIba. (Schneppenheim et al., 2011)
- Ο τύπος VWD 2N χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις στην N-τελική περιοχή (περιοχές D'-D3) της ώριμης υπομονάδας του VWF και σχετίζεται με την εξασθένηση της δέσμευσης του FVIII. Κατά συνέπεια, μειώνονται τα επίπεδα FVIII και μειώνεται σημαντικά ο χρόνος ημιζωής του ενδοφλεβίως χορηγούμενου FVIII (Nishino et al., 1989)

- Επίκτητη νόσος von Willebrand

Το AVWS που περιγράφεται σε ασθενείς με μυελοϊπερπλαστικά σύνδρομα χαρακτηρίζεται από την απώλεια μεγάλων πολυμερών VWF με συνέπεια λειτουργική ανεπάρκεια. Η απώλεια των μεγάλων πολυμερών φαίνεται ότι οφείλεται σε μειωμένη επιβίωση μετά την έκκριση. Η αυξημένη κάθαρση μεγάλων πολυμερών έχει προταθεί ως αποτέλεσμα της ενισχυμένης δέσμευσης στα αιμοπετάλια. Ωστόσο, η δέσμευση του VWF σε μεμονωμένα αιμοπετάλια από ασθενείς με βασική θρομβοκυτταραιμία (ET) και ασθενείς με αντιδραστική θρομβοκυττάρωση δεν ήταν σημαντικά διαφορετική από εκείνη των φυσιολογικών μαρτύρων, όπως προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής (Elliott, 2005).

- Καρδιαγγειακά νοσήματα (CVD)

Κατά τη διάρκεια της αιμοστατικής διαδικασίας, ο VWF διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον σχηματισμό θρόμβων για να αποτρέψει την υπερβολική αιμορραγία. Αυτή η ίδια ικανότητα για την προαγωγή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε συνθήκες με

υψηλές διατμητικές τάσεις, που συναντώνται στις αρτηρίες με στένωση, τον καθιστά καθοριστικό παράγοντα στην αθηροθρομβολή (Cécile et al., 2012). Μια σειρά δημογραφικών μελετών έδειξε ότι τα αυξημένα επίπεδα VWF αποτελούν παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα (CVD), καθώς διερευνάται εάν τα υψηλά επίπεδα VWF αντιπροσωπεύουν την πραγματική αιτία των CVD ή αποτελούν δείκτη της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, που μπορεί να είναι η αιτία των CVD (van Schie et al., 2011).

- Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (TTP)

Την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί αξιοσημείωτη πρόοδος στην κατανόηση της μοριακής βάσης της θρομβωτικής θρομβοκυταροπενικής πορφύρας (TTP). Όπως έχει αναφερθεί, η ADAMTS13 διασπά τα πολυμερή του VWF, οδηγώντας σε βραχύτερα, λιγότερο ενεργά μόρια VWF. Όπως συμβαίνει πάντοτε με τον VWF, τα ελαττώματα στην πρωτεόλυση από ADAMTS13 έχουν παθολογικές συνέπειες που μπορεί να είναι είτε προ-αιμορραγικές είτε προθρομβωτικές. Η τύπου VWD 2A συνδέεται με την προ-αιμορραγική όψη που προκύπτει από την υπερβολική πρωτεόλυση, ενώ η TTP, που σχετίζεται με την ανεπαρκή δραστηριότητα ADAMTS13, συνδέεται με τις θρομβωτικές επιπλοκές που σχετίζονται με την παρουσία πολύ μεγάλων και υπερ-ενεργών πολυμερών VWF (Cécile et al., 2012).

- ADAMTS-13 και συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ)

Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι ο ενεργός συστηματικός ερυθματώδης λύκος (SLE) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (TTP), μια απειλητική για τη ζωή ασθένεια που χαρακτηρίζεται από θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια (TMA). Όπως αναφέρθηκε, η παθογένεση της ιδιοπαθούς TTP (iTTP) είναι η ανεπάρκεια της δραστηριότητας ADAMTS-13. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ανεπάρκεια ADAMTS 13 οφείλεται στον σχηματισμό αντι-ADAMTS 13 αυτοαντισωμάτων. Οι ανωμαλίες ADAMTS-13 έχουν περιγραφεί στον SLE, ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα που να αποδεικνύουν τη συσχέτιση με τη δραστηριότητα της νόσου, την έκταση της σωρευτικής βλάβης των ιστών και άλλες ειδικές παραμέτρους της νόσου. Προτείνεται ότι στο SLE, το φλεγμονώδες, αυτό-αντιδραστικό και προθρομβωτικό περιβάλλον μπορεί να εξηγήσει τυχόν ανωμαλίες ADAMTS-13. Μία αύξηση στα μεγάλα πολυμερή VWF, που προκαλείται από φλεγμονώδεις κυτοκίνες, διατμητική τάση ή αγγειακό τραυματισμό, μπορεί αρχικά να προκαλέσει αύξηση της δραστηριότητας της ADAMTS-13. Ωστόσο, σε περιπτώσεις ταχείας και μαζικής παραγωγής πολυμερών VWF, αυτό μπορεί να ακολουθηθεί από μειωμένη ή/και ανεπαρκή δραστηριότητα ADAMTS-13 λόγω κατανάλωσης (Klonizakis et al., 2013).

2. ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΚΑΙ ADAMTS-13

2.1 Μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα (MPD)

Τα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα αποτελούν μία ενδιαφέρουσα ετερογενή ομάδα αιματολογικών παθήσεων, με κοινό χαρακτηριστικό τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων ενός ή περισσότερων κυττάρων της μυελικής σειράς. Παλαιότερα, αναφέρονταν ως μυελοϋπερπλαστικά «σύνδρομα», σήμερα όμως θεωρείται σωστότερος ο όρος «νεοπλάσματα», γιατί πρόκειται για «κλωνικές» καταστάσεις, όπου ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός αρχίζει από ένα μόνο αρχέγονο κύτταρο, το οποίο αποδεικνύεται ισχυρότερο και προοδευτικά υπερτερεί από τα όμοιά του φυσιολογικά κύτταρα. Αρχικά, τα μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα περιλάμβαναν την **χρόνια μυελογενή λευχαιμία** (αύξηση κυττάρων της μυελικής σειράς), την **αληθή πολυκυτταραιμία** (αληθής ερυθραιμία, αύξηση ερυθροκυττάρων), την **ιδιοπαθή θρομβοκυτταραιμία** (υπερπλασία μεγακαρυοκυττάρων, αύξηση αιμοπεταλίων) και την **πρωτοπαθή μυελοϊνωση** (αύξηση της ίνωσης του μυελού). Σήμερα, ο κατάλογος έχει διευρυνθεί με την προσθήκη περιπτώσεων με υπέρμετρο πολλαπλασιασμό άλλων μυελικών κατηγοριών (ηωσινόφιλα, βασεόφιλα κύτταρα κ.ά.) και την προσθήκη καταστάσεων, όπου η υπερπλασία συνοδεύεται από μυελοδυσπλασία (MYN/ΜΔΣ), ενώ η χρόνια μυελογενής λευχαιμία αναφέρεται ως χωριστή οντότητα, επειδή έχει συγκεκριμένο παθογενετικό μηχανισμό. Έτσι σήμερα, ισχύει η κατάταξη που διαμορφώθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας του 2008 ([Πίνακας 2.](#)). Η μοριακή παθογένεια των MYN είναι σχετικά παρόμοια. Πρόκειται είτε για επίκτητες χρωμοσωμικές μεταθέσεις, οι οποίες συνηθέστερα εμπλέκουν γονίδια που κωδικοποιούν κινάσες της τυροσίνης και οδηγούν στον σχηματισμό υβριδικών πρωτεϊνών, ή για σημειακές μεταλλάξεις σε ρυθμιστικές περιοχές τέτοιων γονιδίων. Το τελικό αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις είναι η διαταραχή της ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος με δραστικότητα πολλαπλάσια της φυσιολογικής ([Λουκόπουλος, 2015](#)).

Πίνακας 2. : Κατάταξη μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασιών από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (2008)

Μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα
Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία, BCR-ABL1 θετική
Αληθής Πολυκυτταραιμία
Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία
Πρωτοπαθής Μυελοϊνωση
Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία
Χρόνια Ηωσινοφιλική Λευχαιμία, μη άλλως ταξινομημένη
Υπερηωσινοφιλικό Σύνδρομο
Μαστοκυττάρωση
Μυελοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα, αταξινόμητα

2.1.1 Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (CML)

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (CML), είναι ένας καρκίνος των λευκών αιμοσφαιρίων. Πρόκειται για μια μορφή λευχαιμίας που χαρακτηρίζεται από την μεγάλη

και άναρχη αύξηση των μυελοειδών κυττάρων στον μυελό των οστών και τη συσσώρευση αυτών των κυττάρων στο αίμα. Η CML είναι μια κλωνική διαταραχή βλαστικών κυττάρων μυελού των οστών στην οποία γίνεται πολλαπλασιασμός ώριμων κοκκιοκυττάρων (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα) και των πρόδρομών τους. Είναι ένας τύπος μυελοϋπερπλαστικού νεοπλάσματος που σχετίζεται με μια χαρακτηριστική χρωμοσωμική μετατόπιση που έχει ως αποτέλεσμα το χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας (Provan et al., 2010).

2.1.2 Αληθής Πολυκυτταραιμία (PV)

Η Αληθής Πολυκυτταραιμία (PV) είναι ένα ασυνήθιστο νεόπλασμα στο οποίο ο μυελός των οστών δημιουργεί πάρα πολλά ερυθρά αιμοσφαίρια. Μπορεί επίσης να οδηγήσει σε υπερπαραγωγή λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων (Berlin, 1975).

2.1.3 Βασική Θρομβοκυτταραιμία (ET)

Η Βασική Θρομβοκυτταραιμία (ET) είναι μια σπάνια χρόνια πάθηση του αίματος που χαρακτηρίζεται από την υπερπαραγωγή των αιμοπεταλίων (θρομβοκύτταρα) από μεγακαρυοκύτταρα στο μυελό των οστών. Μπορεί, αν και σπάνια, να εξελιχθεί σε οξεία μυελογενή λευχαιμία ή μυελοϊνωμάτωση. Είναι ένα από τα βασικά μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα (διαταραχές του αίματος που εμφανίζονται όταν το σώμα παράγει πάρα πολλά λευκά ή ερυθρά αιμοσφαίρια ή αιμοπετάλια) (Beer et al., 2009).

2.1.4 Μυελοϊνωμάτωση (MF)

Η Μυελοϊνωμάτωση (MF), είναι ένας σχετικά σπάνιος καρκίνος του μυελού των οστών. Αυτή τη στιγμή ταξινομείται ως μυελοϋπερπλαστικό νεόπλασμα, στο οποίο ο πολλαπλασιασμός ενός μη φυσιολογικού κλώνου των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων στο μυελό των οστών οδηγεί σε ίνωση ή σε αντικατάσταση του μυελού με ουλώδη ιστό. Ο όρος μυελοϊνωμάτωση αναφέρεται συνήθως στην πρωτογενή μυελοϊνώση (PMF), γνωστή και ως χρόνια ιδιοπαθής μυελοϊνώση (cIMF). Οι όροι ιδιοπαθής και πρωτογενής δηλώνουν ότι σε αυτές τις περιπτώσεις η ασθένεια είναι άγνωστης προέλευσης. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη μυελοϊνώση που αναπτύσσεται δευτερογενώς στην PV ή στην ET. Η μυελοϊνωμάτωση είναι μια μορφή μυελοειδούς μεταπλασίας, η οποία αναφέρεται σε μια μεταβολή του κυτταρικού τύπου στο μυελό των οστών και συχνά οι δύο όροι χρησιμοποιούνται ως συνώνυμα (Tefferi et al., 2014).

2.1.5 Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία (CNL)

Η Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία (CNL) είναι ένα σπάνιο μυελοϋπερπλαστικό νεόπλασμα που παρουσιάζει μόνιμη ουδετεροφιλία στο περιφερικό αίμα, μυελοειδή υπερπλασία στον μυελό των οστών, ηπατοσπληνομεγαλία και απουσία χρωμοσωμάτων Φιλαδέλφειας ή γονιδίου σύντηξης BCR/ABL (Jaffe et al., 2001).

2.1.6 Χρόνια Ηωσινοφιλική Λευχαιμία (CEL)

Η Χρόνια Ηωσινοφιλική Λευχαιμία (CEL) είναι μια ασθένεια στην οποία πάρα πολλά ηωσινόφιλα βρίσκονται στο μυελό των οστών, στο αίμα και σε άλλους ιστούς. Η CEL μπορεί να παραμείνει στο ίδιο στάδιο για πολλά χρόνια ή μπορεί να προχωρήσει γρήγορα σε οξεία λευχαιμία. Γενικά προκαλείται από υπερενεργοποίηση ογκογονιδίου, μέσω μετατόπισης χρωμοσωμάτων ή σύντηξης μεταξύ δύο γονιδίων στο ίδιο χρωμόσωμα (Reiter et al., 2017).

2.1.7 Μαστοκυττάρωση

Η Μαστοκυττάρωση, ένας τύπος ασθένειας των ιστιοκυττάρων, είναι μια σπάνια διαταραχή που προκαλείται από τη συσσώρευση ελαττωματικών λειτουργικά μαστοκυττάρων και των προδρόμων ιστιοκυττάρων CD34⁺ (Horny et al., 2017).

2.2 Θρόμβωση και αιμορραγία στην PV και στην ET

Παρά τις δεκαετίες κλινικής και εργαστηριακής έρευνας, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως η παθογένεση καθώς και οι παράγοντες κινδύνου για θρόμβωση και αιμορραγία στις μυελούπερπλασιαστικές διαταραχές. Στην PV, το προθρομβωτικό αποτέλεσμα ενός αυξημένου αιματοκρίτη είναι καλά εδραιωμένο. Αντίθετα, η θρομβοκυττάρωση δεν έχει ενοχοποιηθεί με παρόμοιο τρόπο όπως η ET. Και στις δύο περιπτώσεις, η προχωρημένη ηλικία και η παρουσία ενός προηγούμενου συμβάντος έχουν ως αποτέλεσμα να βρεθούν ασθενείς με προδιάθεση για θρόμβωση. Μία σημαντική μειονότητα των ασθενών εμφανίζει μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης von Willebrand υψηλού μοριακού βάρους στο πλάσμα κατά τη διάρκεια της ακραίας θρομβοκυττάρωσης και πιστεύεται ότι αυτό μπορεί να εξηγήσει την αιμορραγική διάθεση τέτοιων ασθενών. (M. A. Elliott, 2005)

Επίπτωση: Σε PV και ET είναι δύσκολο να εκτιμηθεί πλήρως η εμφάνιση είτε θρόμβωσης είτε αιμορραγίας. Ωστόσο η συχνότητα θρόμβωσης (αρτηριακή, φλεβική και μικροκυκλοφορική) φαίνεται να είναι σταθερά μεγαλύτερη από αυτή της αιμορραγίας. (M. A. Elliott, 2005)

2.3 Φαινότυπος PV και ET

Θρόμβωση. Η θρόμβωση σε PV και ET εμφανίζεται σε αρτηριακές, φλεβικές ή μικροκυκλοφορικές θέσεις. Γενικά, τα αρτηριακά συμβάντα υπερισχύουν των φλεβικών. Σημαντικά αρτηριακά εγκεφαλοαγγειακά ή καρδιαγγειακά συμβάντα και ενδοφλέβια είναι πιο συνηθισμένα στην PV ενώ οι μικροκυκλοφοριακές εκδηλώσεις είναι πιο συχνές στην ET. Τα μεγάλα αρτηριακά συμβάντα των αγγείων είναι η κυρίαρχη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας και περιλαμβάνουν, κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας, εγκεφαλοαγγειακά (εγκεφαλικό επεισόδιο και παροδικά ισχαιμικά επεισόδια), έμφραγμα του μυοκαρδίου και περιφερική αρτηριακή απόφραξη. (M. A. Elliott, 2005)

Διαταραχές μικροκυκλοφορίας. Τα μικροκυκλοφοριακά συμπτώματα (κεφαλαλγία, παραισθησία, ερυθρομελαλγία) είναι πιο συνηθισμένα σε ET από ότι στην PV. Η

ερυθρομελαλγία είναι ένα μικροαγγειακό θρομβωτικό σύνδρομο, το οποίο εμφανίζεται με μονομερές ή διμερές ασύμμετρο ερύθημα, συμφόρηση και καύση πόνου στα χέρια και τα πόδια. Ελλείπει θεραπεία, αυτό μπορεί να προχωρήσει στην ακροκυανική ισχαιμία και, τελικά, στην ειλικρινή περιφερική γάγγραινα (Michiels, 1997). Ιστοπαθολογικές μελέτες επιδεικνύουν αρτηριακούς μικροθρόμβους πλούσιους σε αιμοπετάλια με ενδοθηλιακή φλεγμονή και πολλαπλασιασμό του εσωτερικού. Η αυξημένη κατανάλωση αιμοπεταλίων καταδεικνύεται κατά τις επιθέσεις, και οι θρόμβοι περιέχουν άφθονο παράγοντα von Willebrand (VWF) σε συνδυασμό με αιμοπετάλια, αλλά ελάχιστη φιμπρίνη (van Genderen et al, 1995, 1996a).

Αιμορραγία. Οι εκδηλώσεις αιμορραγίας τόσο σε PV όσο και σε ET περιλαμβάνουν κυρίως το δέρμα και τους βλεννογόνους, υποδηλώνοντας ελαττωματική πρωτογενή αιμόσταση και περιλαμβάνουν εκχύμωση, επίσταξη, μηνορραγία (στις γυναίκες) και αιμορραγία των ούλων. Αυτός ο τύπος αιμορραγίας είναι σύμφωνος με τα ελαττωματικά αιμοπετάλια ή με τη νόσο von Willebrand (VWD) (M. A. Elliott, 2005). Λαμβάνοντας υπόψη την κλωνική παραγωγή των αιμοπεταλίων σε MPD, ένα δυσλειτουργικό αιμοπετάλιο θεωρείται ο κύριος ένοχος στις αιμορραγικές εκδηλώσεις. Εντούτοις, αυξανόμενα δεδομένα υποδεικνύουν ότι αυτό μπορεί να συμβεί μόνο έμμεσα, καθώς η θρομβοκυττάρωση μπορεί να προκαλέσει επίκτητο σύνδρομο von Willebrand (AVWS), που μπορεί να αντιπροσωπεύει σημαντικό ποσοστό αιμορραγικών επεισοδίων (Budde et al, 1993; Budde & van Genderen, 1997). Επιπλέον, η γενική έλλειψη συσχέτισης μεταξύ των ανωμαλιών της λειτουργίας των αιμοπεταλίων και της κλινικής αιμορραγίας υποδεικνύει εναλλακτικούς μηχανισμούς. (M. A. Elliott, 2005)

2.4 Παθογένεση PV και ET

Λειτουργικές και δομικές ανωμαλίες των αιμοπεταλίων.

Η αυθόρμητη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων είναι ένα χαρακτηριστικό εύρημα των MPD και αρχικά αναφέρθηκε ως πιθανός προγνωστικός παράγοντας θρομβωτικού κινδύνου (Wu, 1978).

Η επίκτητη ανεπάρκεια δεξαμενής αποθήκευσης είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των MPD και, σε αντίθεση με τη συγγενή μορφή, είναι πιθανώς μια εκδήλωση μη φυσιολογικής ενεργοποίησης αιμοπεταλίων in-vivo με αποτέλεσμα την απελευθέρωση κοκκίων (Wehmeier et al, 1990). Αποδεικτικά στοιχεία για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε MPD προέρχονται από τα αυξημένα επίπεδα μεταβολιτών αραχιδονικού του πλάσματος και των ούρων [θρομβοξάνης B2 (TX B2)], πρωτεϊνών α κοκκίων (αυξητικό παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια, β-Θρομβοβουλίνη, παράγοντα αιμοπεταλίων 4) και δείκτες μεμβράνης ενεργοποίησης αιμοπεταλίων. Ο τελευταίος συνήθως αξιολογείται με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα προς ρ-σελεκτίνη, θρομβοσπονδίνη και τον ενεργοποιημένο υποδοχέα ινωδογόνου, GPIIb / IIIa (Jensen et al, 2000b).

Οι MPD-ειδικές ατέλειες στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ανώμαλη και συνεχή παραγωγή θρομβοξάνης A2 (TX A2) (Landolfi et al, 1992; Rocca et al, 1995). Η κυκλοοξυγενάση-1 (COX-1) μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε TX A2, η οποία είναι ισχυρό αγγειοσυσταλτικό και επαγωγέας της συσσώρευσης αιμοπεταλίων, και αναστέλεται αποτελεσματικά από χαμηλή δόση ασπιρίνης που ανακουφίζει επίσης και μικροαγγειακά συμπτώματα (Michiels et al, 1985, 1996; Landolfi et al, 1992; Rocca et al, 1995). Παρά το γεγονός ότι η ενδογενής TX A2 δεν είχε αποδειχθεί ότι μπορεί να προβλέψει θρομβωτικές επιπλοκές, σε πρόσφατη έρευνα όπου η χαμηλή δόση ασπιρίνης βοηθά στη μείωση του κινδύνου θρόμβωσης σε PV βγαίνει το συμπέρασμα για την κλινική σημασία της αυθόρμητης παραγωγής TX A2 στην παθογένεση του θρομβωτικού φαινοτύπου που παρατηρήθηκε σε PV και ET. (Elliott, 2005)

Ανωμαλίες του υποδοχέα της μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Πολλαπλές ανωμαλίες της πρωτεΐνης επιφανείας της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και του υποδοχέα έχουν καταδειχθεί σε MPD. Μία από τις πρώτες παρατηρήσεις ήταν η μειωμένη έκφραση αδρενεργικού υποδοχέα, που θεωρήθηκε ένοχος για την συχνά παρατηρούμενη μειωμένη ή απύουσα απόκριση σε επινεφρίνη σε μελέτες συσσωμάτωσης. Πρόσθετες μελέτες έδειξαν ότι η τελευταία θα μπορούσε, σε ορισμένες περιπτώσεις, να οφείλεται σε διαταραχή της μεταγωγής σήματος του υποδοχέα (Ushikubi et al, 1990). Οι υποδοχείς της μεμβράνης των αιμοπεταλίων GP Ib και GP IIb/IIIa έχουν δείχθει ότι μειώνονται σε PV και ET χρησιμοποιώντας ποσοτικές ραδιοσημασμένες και πιο πρόσφατα κυτταρομετρικές φθορίζουσες τεχνικές μονοκλωνικού αντισώματος (Mazzucato et al, 1989; Le Blanc et al, 1998; Jensen et al, 2000b). Παρά την in vitro επίδειξη ανεπάρκειας αυτών των βασικών υποδοχέων αποτελεσματικής αιμόστασης, δεν έχει αποδειχθεί καμία συσχέτιση με την κλινική αιμορραγία και αυτές οι ανωμαλίες δεν έχει αποδειχθεί ότι έχουν κάποιο κλινικό ρόλο στην ταυτοποίηση των ασθενών που διατρέχουν κίνδυνο αιμορραγίας. Αντίθετα, η επιφανειακή έκφραση του GPIV αυξάνεται και πιθανώς συσχετίζεται με ιστορικό προγενέστερης θρόμβωσης (Jensen et al, 2000b).

Ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων. Ο πιθανός ρόλος των κλωνικών λευκοκυττάρων στην παθογένεση της θρόμβωσης σε PV και ET ερευνήθηκε πρόσφατα και είναι σύμφωνος με την καθιερωμένη αντιθρομβωτική επίδραση της μυελοκατασταλτικής θεραπείας (Berk et al, 1981; Cortelazzo et al, 1995). Μελετήθηκαν μια σειρά παραμέτρων ενεργοποίησης ουδετερόφιλων (CD11b, αλκαλική φωσφατάση λευκοκυττάρων, ελασάση κυττάρων, ελασάση πλάσματος και μυελοϋπεροξειδάση) καθώς επίσης και δείκτες ενδοθηλιακών βλαβών [θρομβομοντουλίνη, αντιγόνο VWF (VWF:Ag)] και θρομβοφιλικής κατάστασης (σύμπλοκο θρομβίνης- 1, 2, D-διμερές) και τα αποτελέσματα υποδηλώνουν την συχνή εμφάνιση ενεργοποίησης ουδετερόφιλων, καθώς και υψηλά επίπεδα πλάσματος ενδοθηλιακών δεικτών και δεικτών υπερ-πήξης τόσο σε PV όσο και σε ET, σε σύγκριση με μάρτυρες. (Falanga et al, 2000)

Σε άλλη έρευνα το μέσο ποσοστό των συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων σε σύγκριση με τους μάρτυρες, αυξήθηκε σε ασθενείς με MPD και αυτό το εύρημα συσχετίστηκε με τον αριθμό των αιμοπεταλίων, το ποσοστό της P-σελεκτίνης και των

θετικών για θρομβοσπονδίνη αιμοπεταλίων καθώς και την έκφραση GPIV στα αιμοπετάλια. Μεταξύ των ασθενών με MPD, συσχετίστηκε ιστορικό είτε μικροαγγειακών διαταραχών είτε θρομβωτικού συμβάντος με ένα ακόμη υψηλότερο μέσο ποσοστό συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων. Συνεπώς, το παραπάνω σύνολο παρατηρήσεων προσφέρει έναν εναλλακτικό και συμβάλλοντα μηχανισμό θρόμβωσης σε MPD. (Jensen et al, 2001)

2.5 Ανωμαλίες VWF αιμοπεταλίων σε μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα

Οι μετρήσεις του παράγοντα von Willebrand στο πλάσμα και στα αιμοπετάλια, η πολυμερική μορφή και η σύνθεση υπομονάδων του VWF του πλάσματος λήφθηκαν σε 29 ασθενείς με χρόνια μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα. Το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξαν οι ερευνητές είναι ότι οι ανωμαλίες του VWF στο πλάσμα και στα αιμοπετάλια είναι κοινά ευρήματα στα μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα και είναι πιο σοβαρά στην ET. Οι πιο έντονες ανωμαλίες του VWF αιμοπεταλίων στην ET μπορεί να αντικατοπτρίζουν τα συχνότερα συμπτώματα αιμορραγίας που παρατηρούνται σε αυτή τη διαταραχή. (Castaman et al., 1995). Αρκετοί ερευνητές περιέγραψαν την ενισχυμένη πρωτεόλυση του VWF σε ET και σε άλλες καταστάσεις θρομβοκυττάρωσης, όπως κρίνεται από την αύξηση των πρωτεολυτικών θραυσμάτων του VWF των 140 και 176 kDa. Αυτά τα θραύσματα προέρχονται από πρωτεολυτική διάσπαση, μεσολαβούμενη φυσιολογικά από την πρωτεάση διάσπασης ADAMTS13. Υποθέτοντας ότι τα αιμοπετάλια εμπλέκονται στην αυξημένη πρωτεόλυση των μεγαλύτερων πολυμερών VWF, παραμένει να καθοριστεί πώς συμβαίνει αυτό. Σε καταστάσεις θρομβοκυττάρωσης η αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων μπορεί να διευκολύνει την αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα επιφανείας αιμοπεταλίων GP Ib και του VWF, επάγοντας έτσι τις κατάλληλες διαμορφωτικές αλλαγές στον VWF που επιτρέπουν στην ADAMTS 13 να αποκτήσει πρόσβαση στη θέση διάσπασής του. Σε υψηλότερους αριθμούς αιμοπεταλίων, αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να ενισχυθεί, προκαλώντας υπερβολική διάσπαση (M. A. Elliott, 2005).

Στην έρευνα των Meschengieser S et al. μετρήθηκε ο λόγος VWF:Ag και το ινωδογόνο (FI) στα προϊόντα λύσης αιμοπεταλίων σε 11 ασθενείς με PV, 10 με ET, 14 με χρόνια μυελοκυτταρική λευχαιμία (CML) και 3 με μυελοϊνωμάτωση (MF) και αυτά τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με ανωμαλίες της λειτουργίας των αιμοπεταλίων. Τα χαμηλά ενδοαιμοπεταλικά συστατικά των VWF:Ag και FI, που παρατηρούνται συχνότερα σε ET και PV, μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και της *in vivo* απελευθέρωσης, αλλά η δυσλειτουργία των μεγακαρυοκυττάρων είναι πιθανότερη στη μυελοϊνωση. (Meschengieser et al., 1987).

Οι Tatewaki et al. μελέτησαν τη πολυμερική σύνθεση του VWF πλάσματος σε 26 ασθενείς με χρόνια μυελοκυτταρική λευχαιμία (CML) (13 σε χρόνια φάση, 8 σε κρίση έκρηξης, 5 τόσο σε χρόνια φάση όσο και σε κρίση έκρηξης). Τα συμπεράσματα στα οποία κατέληξαν είναι ότι μερικοί ασθενείς με CML, ειδικά σε χρόνια φάση, στερούνται μεγάλων πολυμερών. Η αρνητική συσχέτιση της σχετικής ποσότητας μεγάλων πολυμερών με τον αριθμό των αιμοπεταλίων και των κοκκιοκυττάρων υποδεικνύει ότι

μεγάλα πολυμερή μπορεί να καταναλωθούν όταν ο αριθμός αιμοπεταλίων είναι μεγάλος ή να κοπούν από πρωτεάσες λόγω αυξημένων κυττάρων αίματος (Tatewaki et al., 1988).

2.6 Μοριακή διάγνωση μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων

Χρωμόσωμα Ph.

Η ανακάλυψη του χρωμοσώματος της Φιλαδέλφειας το 1960 ορίζει με ακρίβεια την CML ως κλινική οντότητα που χαρακτηρίζεται από ακραία λευκοκυττάρωση, σπληνομεγαλία και υψηλό κίνδυνο προόδου προς οξεία λευχαιμία (Nowell et al., 1960). Αυτή η ανακάλυψη άνοιξε το δρόμο για την ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων και στοχευμένων θεραπειών που έχουν αλλάξει δραματικά την κλινική πορεία αυτής της νόσου (Busque et al., 2016).

Μετάλλαξη JAK2 V617F

Ομοίως, οι σημαντικές πρόοδοι που σημειώθηκαν κατά την τελευταία δεκαετία, συμπεριλαμβανομένης της ανακάλυψης της μετάλλαξης JAK2 V617F (Levine et al., 2005) επιτρέπουν πλέον την αναγνώριση μοριακών δεικτών σε όλους σχεδόν τους ασθενείς με PV καθώς και στους περισσότερους ασθενείς με ET ή MF. Η εργαστηριακή ανίχνευση της μετάλλαξης JAK2 V617F που γίνεται με PCR, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και ειδική για ένα MPN. Ένα θετικό αποτέλεσμα υποστηρίζει τη διάγνωση ενός MPN (Bench et al., 2013). Ωστόσο, ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει τη διάγνωση ενός MPN για αυτό το λόγο, τέτοιοι ασθενείς θα πρέπει να υποβληθούν σε περαιτέρω μοριακές εξετάσεις (Busque et al., 2016).

Μεταλλάξεις στο JAK2 Exon 12

Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 17 διαφορετικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 12 (Wong et al., 2007). Μέχρι τώρα, οι μεταλλάξεις εντός του εξωνίου 12 του JAK2 έχουν αναφερθεί μόνο σε ασθενείς με PV (Wong et al., 2007). Δεδομένου ότι η παρουσία μετάλλαξης του εξωνίου 12 στο JAK2 σε ασθενή με ερυθροκυττάρωση είναι διαγνωστική για την PV, έχει προταθεί ότι όλοι οι ασθενείς με ανεξήγητη ερυθροκυττάρωση οι οποίοι είναι αρνητικοί για JAK2 V617F θα πρέπει να υποβληθούν σε έλεγχο για μεταλλάξεις στο εξόνιο 12 του JAK2. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για έλεγχο μετάλλαξης στο εξόνιο 12 του JAK2 είναι αλληλούχιση κατά Sanger. Άλλες, πιο ευαίσθητες μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί, περιλαμβάνουν την ανάλυση τήξης υψηλής διακριτότητας και την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Rapado et al., 2009; Ugo et al., 2010).

Καλρετικουλίνη

Το 2013, δύο ανεξάρτητα εργαστήρια ταυτοποίησαν το γονίδιο που κωδικοποιεί την CALR ως νέο γονίδιο καρκίνου που μεταλλάσσεται στους περισσότερους ασθενείς με PMF ή ET που είναι αρνητικοί για JAK2 V617F ή MPL (Nangalia et al., 2013). Μεταξύ των ασθενών με ET ή PMF με μη μεταλλαγμένο JAK2 V617F ή MPL, οι μεταλλάξεις CALR ανιχνεύθηκαν στο 67% αυτών με ET και 88% αυτών με PMF. Έτσι, οι CALR μεταλλάξεις έχουν σημαντική διαγνωστική αξία και η συμπερίληψή τους σε

διαγνωστικούς αλγόριθμους θα ελαχιστοποιήσει την αναγκαιότητα πρόσθετων δοκιμών σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με ET ή PMF. Οι αναλύσεις για μεταλλάξεις CALR βασίζονται στο DNA και χρησιμοποιούν ανάλυση μήκους θραυσμάτων. Μπορούν να πραγματοποιηθούν σε δείγματα περιφερικού αίματος. Εντούτοις, καθώς έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις βλαστικής γραμμής σε CALR, πρέπει να δίνεται προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων στο κατάλληλο κλινικό πλαίσιο (Busque et al., 2016).

Μεταλλάξεις στο MPL γονίδιο

Τουλάχιστον πέντε διαφορετικές παθογενετικές μεταλλάξεις εντός του εξωνίου 10, που επηρεάζουν το κωδικόνιο S505 ή W515 του υποδοχέα θρομβοποιητίνης, MPL, έχουν περιγραφεί σε περίπου 5% έως 10% των ασθενών με ET και PMF (Szuber et al., 2016). Ο έλεγχος για μετάλλαξη MPL θα πρέπει να εκτελείται μόνο μετά από βιοψία μυελού των οστών καθώς και σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν υποψίες για MPN παρόλο που ο ασθενής είναι αρνητικός για μεταλλάξεις JAK2 V617F και CALR. Η δοκιμή μετάλλαξης MPL μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση δείγματος περιφερικού αίματος. Η χρήση μιας τεχνικής PCR με σύστημα ανθεκτικότητας στην ενίσχυση της μετάλλαξεως (ειδική αλληλόμορφη PCR που περιλαμβάνει τις παραλλαγές S505N, W515L, W515A, W515R και W515K) είναι μια οικονομικά αποδοτική εναλλακτική λύση έναντι της αλληλούχισης του Sanger (Busque et al., 2016).

Αξιολόγηση BCR-ABL1

Ιστορικά, ο αποκλεισμός της CML ήταν το πρώτο και μόνο βήμα στη μοριακή έρευνα των MPN. Τώρα, συνιστάται η διεξαγωγή δοκιμών BCR-ABL σε ασθενείς που δεν έχουν μεταλλάξεις στα JAK2, CALR και MPL ή σε ασθενείς με χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν CML, καθώς έχει αναφερθεί σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις BCR-ABL και JAKV617F (Beer et al., 2018). Η δοκιμασία αυτή πραγματοποιείται με FISH ή με μελέτη καρυότυπου καθώς επίσης και με τη χρήση της λιγότερο δαπανηρής τεχνικής αντίστροφης μεταγραφής-PCR (RT-PCR) (Busque et al., 2016).

Αξιολόγηση αιμόστασης

Η αξιολόγηση της συστηματικής πήξης, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου προθρομβίνης (PT), του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT), του χρόνου θρομβίνης και του επιπέδου ινωδογόνου, πρέπει να διεξάγεται σε κάθε περίπτωση MPN (Busque et al., 2016).

Η θρομβοκυττάρωση που σχετίζεται με τα MPNs μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο αιμορραγίας λόγω νόσου von Willebrand (vWD), όπου η κάθαρση του vWF αυξάνεται αναλογικά με τον αριθμό των αιμοπεταλίων. Για να ανιχνευθεί αυτό, είναι σημαντικό να διερευνηθεί η λειτουργική δραστηριότητα καθώς και το επίπεδο αντιγόνου του vWF, αφού η κάθαρση των πλέον αποτελεσματικών πολυμερών υψηλού μοριακού βάρους επηρεάζεται και η συνολική μείωση στο επίπεδο του αντιγόνου μπορεί να μην είναι αξιοσημείωτη (Vannucchi et al., 2014). Έχει αναφερθεί επίσης σε ασθενείς με PV, οι οποίοι έχουν αριθμούς αιμοπεταλίων που είναι μόνο οριακά αυξημένοι, ότι μπορεί να

παίζει κάποιο ρόλο η αυξημένη πιθανότητα διάσπασης του vWF από την ADAMTS13. Ο επίκτητος vWF αποκρίνεται σε κυτταρομειωτική θεραπεία που οδηγεί σε μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων (Tsantes et al., 2011). Οι εργαστηριακές εξετάσεις για την επίκτητη vWD τυπικά περιλαμβάνουν τις εξετάσεις θρομβοεμβολιασμού (PT και APTT) και ειδικές δοκιμασίες για vWD (δραστικότητα αντιγόνου vWF και συμπαράγοντα ριστοκετίνης, με ανάλυση πολυμερών vWF όπως απαιτείται) και δραστικότητα παράγοντα VIII (Tefferi et al., 2010).

Η μετάλλαξη JAK2 V617F στα μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα

Μεταλλάξεις στο γονίδιο Janus kinase 2 (JAK2), ειδικά η JAK2 V617F μετάλλαξη, είναι κοινές σε PV, ET και MF οδηγώντας σε υπερενεργή δραστηριότητα κινάσης και υπερπαραγωγή μυελοειδών προγονικών κυττάρων και συνεπώς υπερπαραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων (Baxter et al., 2005). Οι ασθενείς με ET ή PV έχουν υψηλότερη συχνότητα τόσο θρόμβωσης όσο και αιμορραγίας. Ωστόσο, έχουν καταβληθεί σημαντικές προσπάθειες για την κατανόηση των αιμοστατικών ανωμαλιών σε αυτούς τους ασθενείς. Ως αιτιώδεις παράγοντες για τη θρόμβωση έχουν αναφερθεί οι αυξήσεις στις εγγενείς προβληματικές λειτουργίες των αιμοπεταλίων και των ουδετερόφιλων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs) που εκφράζουν JAK2V617F+ σε έναν υποπληθυσμό ασθενών με MPN και η έκφραση EC συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης. Επιπλέον, ενεργοποίηση των EC που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή P-σελεκτίνης και E-σελεκτίνης και μειωμένη παραγωγή νιτρικού οξειδίου έχει αναγνωριστεί σε ορισμένους ασθενείς. Αντίστροφως, η αιμορραγική διάθεση μερικών ασθενών έχει αποδοθεί στην VWD (Etheridge et al., 2014).

Αν και η αιμορραγική διάθεση σε ET ασθενείς με ακραία θρομβοκυττάρωση αποδίδεται συχνά στο AVWS, η λεπτομερής κατανόηση του τρόπου με τον οποίο αναπτύσσεται αυτή η κατάσταση παραμένει ασαφής. Η πιο αποδεκτή θεωρία είναι ότι τα αιμοπετάλια συνδέονται με προθρομβωτικά υπερμετάβλητα πολυμερή VWF και τα αφαιρούν από το πλάσμα (Etheridge et al., 2014). Επιπροσθέτως, η αυξημένη διάσπαση του VWF από την ADAMTS13 έχει επίσης συσχετιστεί με τον αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων σε ασθενείς ET με αιμορραγικές επιπλοκές (Michiels et al., 2006). Συνεπώς η διερεύνηση των EC σε ασθενείς με ET μπορεί να παρέχει χρήσιμες γνώσεις σχετικά με τους μηχανισμούς που συμβάλλουν στο AVWS (Etheridge et al., 2014).

Από τα αποτελέσματα του πειράματός τους οι ερευνητές οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η έκφραση της JAK2V617F τόσο σε αιμοποιητικά όσο και σε ενδοθηλιακά διαμερίσματα συμβάλλει στην ανώμαλη κατανομή των πολυμερών VWF και εμπλοκή της ADAMTS13 είναι πιθανή. Οι μεταβολές που προκαλούνται από JAK2V617F στον VWF που προέρχεται από EC συμβάλλουν σε αλλαγές που σχετίζονται με το επίκτητο σύνδρομο von Willebrand (Etheridge et al., 2014). Το JAK2 έχει δειχθεί ότι μεσολαβεί στη δραστικότητα eNOS μέσω ενεργοποίησης AKT. Το eNOS με τη σειρά του έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται σε μονοπάτια που επηρεάζουν την εξωκυττάρωση των σωμάτων Weibel-Palade, τα οποία αποθηκεύουν τον VWF (Qian et al., 2001). Πρόσθετα πειράματα μπορεί να αποκαλύψουν στο μέλλον άλλους τρόπους με τους οποίους η

μετάλλαξη JAK2V617F συμβάλλει σε ανωμαλίες στις οδούς σηματοδότησης των EC που εμπλέκονται στην αιμόσταση.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της δραστηριότητας της ADAMTS13 σε ασθενείς με σταθερή κατάσταση μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων, οι οποίοι δεν εκδήλωσαν κάποιο συμβάν τους τελευταίους 6 μήνες.

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Οργανολογία

1. Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες για αραιώσεις δείγματος ασθενούς και αραιώση υποστρώματος
2. Ρυθμιζόμενες μικροπιπέτες για 10-100 µL και tips των 100-1000 µl
3. Φθορίζουσα πλάκα ανάγνωσης ικανής να μετρά φθορισμό σε Διέγερση = 340-350 nm και Εκπομπή = 440-450 nm
4. Χρονοδιακόπτης
5. Φυγόκεντρος

3.2.2 Υλικά και αντιδραστήρια

Για την εκτέλεση της δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκε το kit ATS-13[®] Activity Assay Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert – Bosch – Strasse 32, 63303 Dreieich, Germany. Η αξιοπιστία του kit έχει τεκμηριωθεί σε προηγούμενες μελέτες (Nakashima et al., 2016; Kokame et al., 2005; Lämmle et al., 2005; Kokame et al., 2004; Lämmle et al., 2004). Το kit περιλαμβάνει:

1. 6 x 130 µL Θετικό μάρτυρα: Υψηλό
2. 6 x 130 µL Θετικό μάρτυρα: Χαμηλό
3. 6 σετ βαθμονομητών, με 5 αντιδραστήρια των 130 µl το καθένα: Βαθμονομητής A, Βαθμονομητής B, Βαθμονομητής C, Βαθμονομητής D, Βαθμονομητής E.
4. 1 x 0,10 mg υποστρώματος
5. 2 Microwell, που το καθένα περιέχει 6-2 x 8 μαύρες λωρίδες Microwell
6. 1 x 14 mL δείγματος αραιώσης
7. Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος 1 x 14 mL
8. DMSO

3.2.3 Τεχνικές

- **ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ADAMTS-13**

Αρχή της μεθόδου

Η δοκιμασία δραστηριότητας ATS-13 βασίζεται στην τεχνολογία μεταφοράς ενέργειας φθορισμού (FRET). Ένα συνθετικό θραύσμα της πρωτεΐνης von Willebrand χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα. Η διάσπαση αυτού του πεπτιδίου μεταξύ δύο τροποποιημένων καταλοίπων απελευθερώνει τις δυνατότητες απόσβεσης του φθορισμού. Αυτή η δοκιμασία βασίζεται στην ποσοτικοποίηση της διάσπασης ενός μικρού θραύσματος του παράγοντα von Willebrand από την πρωτεάση ADAMTS-13. Η διάσπαση αυτού του συνθετικού υποστρώματος ανιχνεύεται με ανάγνωση του φθορισμού που προκύπτει όταν αποκόπτεται το υπόστρωμα.

Διαδικασία δοκιμής

Χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο 20 ασθενών, 10 άντρες και 10 γυναίκες, μέσου όρου ηλικίας 55 χρονών (20-81) και μέσο όρο παρακολούθησης 76m (3-140). 12 διαγνώστηκαν με ET, 6 διαγνώστηκαν με PV και 2 διαγνώστηκαν με πρόωμη μυελοϊνωση. Η ομάδα μαρτύρων/ελέγχου που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από 40 υγιείς αιμοδότες μετά από γραπτή συγκατάθεση. Η γραπτή συγκατάθεση αφορά τόσο τους υγιείς όσο και τους ασθενείς. Όλα τα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα καταγράφηκαν ταυτόχρονα. Η δραστηριότητα της ADAMTS13 μετρήθηκε με φθορίζουσα μέθοδο (FRETs).

Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Για τη δοκιμασία χρησιμοποιείται ως υλικό φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα που συλλέγεται σε 3,2% κιτρικό νάτριο. Δε χρησιμοποιείται πλάσμα που έχει συλλεχθεί ή έχει υποβληθεί σε αγωγή με EDTA.

1. Συλλογή αίματος σε πλαστικό σωλήνα με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου
2. Φύλαξη σωληναρίου σε όρθια θέση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι το στάδιο της φυγοκέντρωσης.
3. Απομάκρυνση δείγματος αίματος αμέσως πριν από τη φυγοκέντρωση αναστρέφοντας απαλά το σωλήνα 8 έως 10 φορές.
4. Φυγοκέντρωση δείγματος αίματος σε οριζόντιο ρότορα για 15-20 λεπτά σε 1500 έως 1800 RCF (Σχετική Φυγοκεντρική Δύναμη) σε θερμοκρασία δωματίου. Η υπερβολική ταχύτητα φυγοκέντρωσης (πάνω από 2000 RCF) μπορεί να προκαλέσει θραύση του σωλήνα και έκθεση σε αίμα και συνεπώς πιθανό τραυματισμό.
5. Μεταφορά των 2/3 του στρώματος πλάσματος σε νέο πλαστικό σωλήνα.
6. Επαναφυγοκέντρωση συλλεγμένου πλάσματος σε 1500 έως 1800 RCF για επιπλέον 15-20 λεπτά ώστε τυχόν ερυθρά αιμοσφαίρια ή αιμοπετάλια να αφαιρεθούν.

7. Μεταφορά των 2/3 του πλάσματος σε ένα νέο πλαστικό σωλήνα, προσέχοντας να μην γίνει διατάραξη οποιοδήποτε κυττάρων στο κάτω μέρος του σωλήνα.

Εκτέλεση δοκιμής

Αρχικά αφήσαμε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου. Έγινε προσδιορισμός του αριθμού των δειγμάτων που εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας το φύλλο καταγραφής και εκχωρήσαμε κάθε δείγμα σε μια θέση που αποτελείται από δύο (διπλότυπα) πηγαδάκια. Στη συνέχεια αφαιρέσαμε την πλάκα microwell από τη θήκη, καθώς και τις ταινίες που δεν χρειαζόμαστε από την πλάκα και επανασφραγίσαμε με προστατευτικό κάλυμμα.



Εικόνα 14. : Αντιδραστήρια

Σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα, αραιώσαμε το δείγμα πλάσματος κάθε δείγματος που θα εξετάζοταν προσθέτοντας 18 μL πλάσματος σε 132 μL δείγματος αραιώσης. Έπειτα προσθέσαμε 50 μL εκάστου βαθμονομητή (εις διπλούν) στα κατάλληλα πηγαδάκια χωρίς να προηγηθεί αραιώση. Το επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη 50 μL θετικού μάρτυρα: Χαμηλού (εις διπλούν) στα κατάλληλα πηγαδάκια χωρίς να προηγηθεί αραιώση. Στη συνέχεια προσθέσαμε 50 μL θετικού μάρτυρα: Υψηλού (εις διπλούν) στα κατάλληλα πηγαδάκια χωρίς να προηγηθεί αραιώση. Ακολούθησε προσθήκη 50 μL προ-αραιωμένου διαλύματος του δείγματος πλάσματος (που παρασκευάστηκε σε προηγούμενο στάδιο) εις διπλούν στα πηγαδάκια. Στη συνέχεια, προετοιμάσαμε το διάλυμα υποστρώματος. Αφαιρέσαμε προσεκτικά το πώμα (καθώς κάποιο υπόστρωμα μπορεί να είχε προσκολληθεί στο πλαστικό) και πραγματοποιήσαμε ανασύσταση του λυοφιλοποιημένου υποστρώματος προσθέτοντας 37 μL DMSO στο φιαλίδιο υποστρώματος. Έπειτα ανακινήσαμε το διάλυμα και προσθέσαμε 113 μL H_2O . Ανακινήσαμε καλά μέχρι να διαλυθούν όλα τα περιεχόμενα. Ακολούθως έγινε

προετοιμασία του διαλύματος υποστρώματος (3%) σε πλαστικό σωλήνα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) :

Πίνακας 3

Δείγμα ασθενών στη δοκιμασία	Όγκος διαλύματος υποστρώματος (μL)	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος (μL)
1	25	795
5	37	1193
10	53	1714
40	150	4850

Στη συνέχεια κάναμε καλή ανάμιξη του διαλύματος και το προστατέψαμε την πλάκα από το φως, κλείνοντάς την σε αλουμινόχαρτο.



Εικόνα 15. : Πλάκα σε αλουμινόχαρτο

Αμέσως μετά την παρασκευή, προσθέσαμε 50 μL διαλύματος υποστρώματος σε κάθε πηγαδάκι που περιείχε δείγμα, βαθμονομητή ή μάρτυρα και προσπαθήσαμε να εξασφαλίσουμε ομοιόμορφη κατανομή.



Εικόνα 16. : Προσθήκη υποστρώματος

Στη συνέχεια, τοποθετήσαμε την πλάκα σε φθοριόμετρο με συνθήκες: Διέγερση = 340 - 350 nm και Εκπομπή = 440 - 450 nm. Στη συνέχεια βγάλαμε τη πλάκα από το φθοριόμετρο και την αφήσαμε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επόμενη μέτρηση.



Εικόνα 17. : Φθοριόμετρο

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάγνωση έπρεπε να γίνει εντός 5 λεπτών από την προσθήκη του υποστρώματος. Ακολούθησε αφαίρεση πλάκας από το φθοριόμετρο και αποθήκευσή

της σε θερμοκρασία δωματίου μέσα σε αλουμινόχαρτο, προστατευμένη από το φως. Τέλος μετά από 30 λεπτά, τοποθετήσαμε πάλι την πλάκα στο φθοριόμετρο με Διέγερση = 340 - 350 nm και Εκπομπή = 440 - 450 nm σε θερμοκρασία δωματίου και καταγράψαμε τα αποτελέσματα.

Κατά την εκτέλεση της δοκιμής δώσαμε έμφαση στα εξής:

1. Αποφύγαμε τη μόλυνση των βαθμονομητών και του υποστρώματος καθώς η ακούσια μόλυνση αυτών των αντιδραστηρίων με το ανθρώπινο πλάσμα θα ακύρωνε τις καθορισμένες τιμές των βαθμονομητών.
2. Δε χρησιμοποιήσαμε τις μικροκυψελίδες και τα αντιδραστήρια του kit σε συνδυασμό με οποιοδήποτε άλλο σύστημα δοκιμής.
3. Δεδομένου ότι η αντίδραση του ενζυματικού υποστρώματος είναι ευαίσθητη στη θερμοκρασία, διεξήχθη σε ελεγχόμενη περιοχή στους 22 έως 25°C.
4. Χρησιμοποιήσαμε μόνο πλάσμα στην ανάλυση, γιατί ο ορός θα έδινε ανακριβή αποτελέσματα.
5. Αποφύγαμε την εισαγωγή σωματιδιακού υλικού (ίνες από χαρτόνι / χαρτοπετσέτα, απορρίμματα αφρού, σκόνη κλπ.) στα πηγαδάκια.

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Χρησιμοποιήσαμε το workbook ανάλυσης ATS-13 που παρέχεται μαζί με το kit για να αποκτήσουμε τα αποτελέσματα (% κανονικής δραστηριότητας ADAMTS-13) για τους μάρτυρες και τα δείγματα.

Τα αποτελέσματα από το φθοριόμετρο λαμβάνονται σε χρόνο 0 και σε χρόνο 30 λεπτών.

Data: 360/40,460/40

Read Index: Show

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2555	2524	9145	9565	97	90	91	98	92	95	93	97
B	2743	2786	3949	4127	90	88	91	94	90	90	92	99
C	3154	3209	4792	3127	93	98	93	99	90	98	101	92
D	3929	3847	663	651	87	98	100	96	93	90	92	96
E	4527	4401	648	639	94	100	95	96	95	96	100	94
F	3583	3465	675	667	90	92	89	98	93	86	87	93
G	2978	2937	658	638	95	91	91	100	97	94	92	95
H	685	638	633	644	92	93	99	88	96	100	102	93

Edit Mask Help

Εικόνα 18. : Ενδεικτικά μερικά αποτελέσματα σε χρόνο 0

Matrix Statistics Com1

Data: 360/40,460/40

Read Index: Show

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2423	2395	10702	10787	93	89	91	89	95	90	93	94
B	2793	2843	5078	5221	90	92	86	93	86	91	90	92
C	3549	3748	5074	3039	92	91	94	95	90	91	83	93
D	4549	4657	629	584	91	93	97	97	91	91	94	97
E	5756	5903	617	610	98	94	88	97	93	93	97	94
F	4135	4015	591	622	89	89	93	92	93	93	94	97
G	3070	3070	619	600	96	95	100	93	91	95	93	97
H	626	607	593	605	90	87	94	89	101	98	98	90

Edit Mask Help

Εικόνα 19. : Ενδεικτικά μερικά αποτελέσματα μετά από 30 λεπτά

Microsoft Excel spreadsheet showing data for B32 and 2423. The spreadsheet includes columns A through O and rows 1 through 26. The data is organized into sections for 0 Minutes and 20-35 Minutes.

0 Minutes

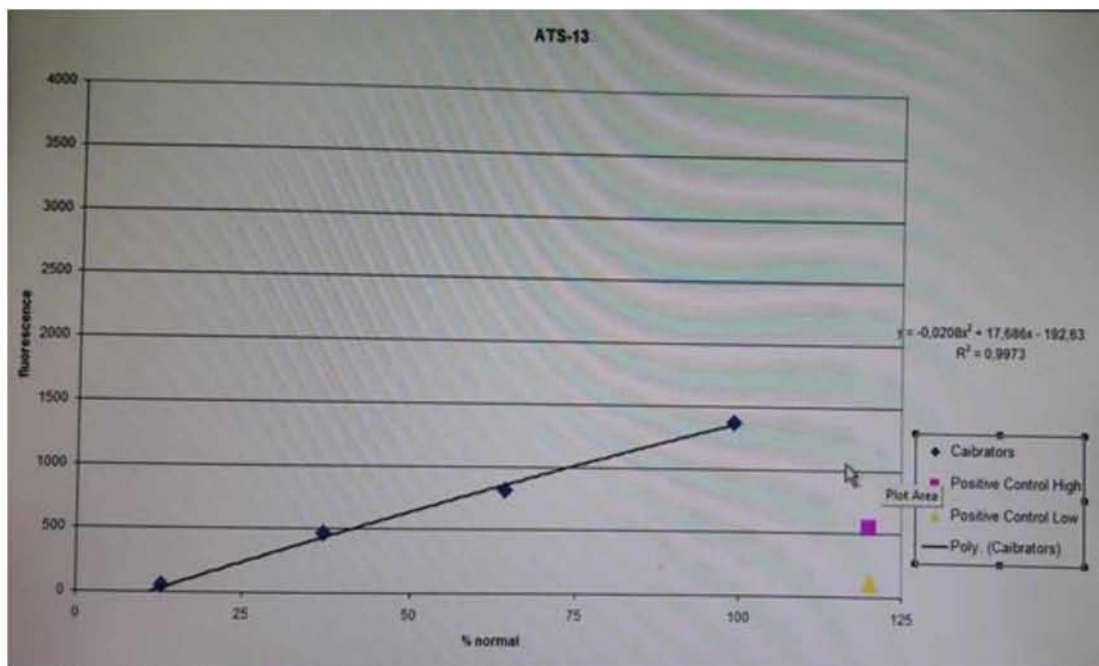
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	2555	2524	9145	9565								
2	2743	2786	3949	4127								
3	3154	3209	4792	3127								
4	3929	3647	663	651								
5	4527	4401	648	639								
6	3583	3465	675	667								
7	2978	2937	658	638								
8	685	638	633	644								

20-35 Minutes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	2423	2395	10702	10787								
2	2793	2843	5078	5221								
3	3549	3748	5074	3039								
4	4549	4657	629	584								
5	5756	5903	617	610								
6	4135	4015	591	622								
7	3070	3070	619	600								

Sum = 100110

Εικόνα 20. : Ενδεικτικά μερικά από τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της ανάλυσης



Εικόνα 21. : Καμπύλη απόκρισης για τα συγκεκριμένα δεδομένα

5	Sample ID	Response	% N ADAMTS-13	$y = -0,3588x^2 + 62,833x - 946,47$		
6				x^2	x	c
7	CalA	-130.5	4	-0.0208	17.686	-192.63
8	CalB	53.5	14			
9	CalC	467	39			
10	CalD	815	61			
11	CalE	1365.5	100			
12	PC: High	551	44			
13	PC: Low	112.5	18			
14						
15	0	-45	8			
16	patient	1389.5	102			
17	qc1	1111.5	82			
18	qc2	97	17			
19	0	-50.5	8			
20	0	-30	9			
21	0	-64.5	7			
22	0	-38.5	9			
23	0	-39.5	9			
24	0	0	11			
25	0	0	11			
26	0	0	11			
27	0	0	11			
28	0	0	11			
29	0	0	11			
30	0	0	11			
31	0	0	11			
32	0	0	11			
33	0	0	11			

Εικόνα 22. : Ενδεικτικά αποτελέσματα της ανάλυσης για τα συγκεκριμένα δεδομένα

Οι τιμές που υπολογίστηκαν για τους θετικούς μάρτυρες (υψηλός και χαμηλός) θα πρέπει να εμπίπτουν εντός του επιτρεπόμενου εύρους που προσδιορίζεται στην ειδική καρτέλα αναφοράς ATS-13, καθώς οι έλεγχοι των δοκιμασιών που δεν πληρούν αυτά τα κριτήρια θεωρούνται άκυροι και επαναλαμβάνονται. Επιπλέον, δοκιμασίες με συντελεστή R^2 μικρότερο του 0.99 θα πρέπει να επαναλαμβάνονται. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο υψηλός θετικός μάρτυρας είναι 44% και ο χαμηλός θετικός μάρτυρας είναι 18%, συνεπώς εμπίπτουν μέσα στο επιτρεπόμενο όριο. Επιπλέον, παρατηρώντας τις τιμές των βαθμονομητών βλέπουμε ότι και αυτές βρίσκονται μέσα στα επιτρεπτά όρια.



REPORTING CARD

ATS-13[®] Activity Assay

REF ATS-13
Kit Lot: 3005887A/B
Expiration: 2019-02-15

RC

For Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.

CALIBRATOR LEVEL	ASSIGNED VALUE*
Calibrator A	5
Calibrator B	13
Calibrator C	37
Calibrator D	64
Calibrator E	99

* (% Normal ADAMTS-13 Activity)

Allowable Range for Positive Controls

High: 46-62% Normal ADAMTS-13 Activity

Low: 16-32% Normal ADAMTS-13 Activity

PAGE:
1 of 1

Immucor GTI Diagnostics, Inc. • 20925 Crossroads Circle • Waukesha, WI 53186 USA
T: 262.754.1000 • F: 262.754.9831 • www.immucor.com

303280.RCEN REV F
2015-03-02

Εικόνα 23. : Καρτέλα αναφοράς

Τα συνολικά αποτελέσματα της εργασίας παραθέτονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 4

Μάρτυρες	% N ADAMTS13
1	98
2	99
3	100
4	101
5	104
6	104
7	105
8	112
9	112
10	113
11	113
12	119
13	119
14	121
15	121
16	123
17	126
18	127
19	128

20	129
21	130
22	132
23	132
24	133
25	137
26	138
27	141
28	145
29	145
30	148
31	148
32	150
33	150
34	154
35	154
36	155
37	157
38	157
39	183
40	198

Πίνακας 5

Ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικά	% N ADAMTS13
1	63
2	69
3	69
4	74
5	78
6	79
7	81
8	83
9	83
10	86
11	87
12	90
13	91
14	91
15	93
16	94
17	98
18	98
19	99
20	102

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Τα φυσιολογικά επίπεδα της δραστικότητας ADAMTS13 είναι αυτά που είναι $\geq 60\%$. Στη συγκεκριμένη εργασία παρατηρήσαμε ότι όλοι οι ασθενείς που πάσχουν από κάποιο μυελούπερπλαστικό σύνδρομο έχουν **χαμηλότερα αλλά όχι μη φυσιολογικά** επίπεδα της δραστικότητας της ADAMTS13.

Στατιστική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism7 για τις δυο ξεχωριστές κατηγορίες (μάρτυρες και ασθενείς με μυελούπερπλαστικό σύνδρομο) και βρέθηκε όπως φαίνεται και παρακάτω $P < 0,0001$. Επομένως, οι ασθενείς έχουν στατιστικά σημαντική μικρότερη τιμή δραστικότητας σε σχέση με τους υγιείς.

Unpaired t test results

P value and statistical significance:

The two-tailed P value is less than 0.0001

By conventional criteria, this difference is considered to be extremely statistically significant.

Confidence interval:

The mean of Control minus MPS equals 46.13

95% confidence interval of this difference: From 35.34 to 56.91

Intermediate values used in calculations:

t = 8.5648

df = 58

standard error of difference = 5.385

Review your data:

Group	Control	MPS
Mean	131.53	85.40
SD	22.72	10.99
SEM	3.59	2.46
N	40	20

Εικόνα 24. : Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έναυσμα για την πραγματοποίηση αυτής της πειραματικής εργασίας ήταν η έλλειψη εκτενούς μελέτης που να συνδυάζει την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13 με τα μυελούπερπλαστικά σύνδρομα.

Η μελέτη-σημείο αναφοράς ήταν αυτή των Adamidou et al. η οποία εκπονήθηκε στο αιματολογικό εργαστήριο του τμήματος ιατρικής των μεταγγίσεων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και θελήσαμε να διεκρινουμε την έρευνα αυτή. Σκοπός της προαναφερθείσας εργασίας ήταν η μελέτη των επιπέδων του vWF και του ppvWF καθώς και του λόγου τους (ppvWF/vWF) όπως ακόμη και η δραστηριότητα της ADAMTS13 σε ασθενείς με σταθερή κατάσταση μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων. Οι ερευνητές εκτίμησαν την αυξομείωση των ανωτέρων παραμέτρων όσον αφορά τις ενδείξεις θρόμβωσης προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι παράγοντες κινδύνου για θρομβωτικά γεγονότα. Στα αποτελέσματά τους, βρέθηκαν χαμηλότερα επίπεδα δραστηριότητας ADAMTS13 σε πλάσμα ασθενών σε σύγκριση με τους μάρτυρες (99.4% και 125% αντίστοιχα, $P < 0.001$). Αντίστροφη συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ ADAMTS13 και vWFAg ($P < 0.05$) σε ασθενείς καθώς το τελευταίο είχε συσχετιστεί με τα επίπεδα ppvWF ($P < 0.001$). Θρομβωτικά γεγονότα συνέβησαν σε 11/37 ασθενείς (7CNS/2 DVT/1BuddChiari). Επίσης, 22/37 ασθενείς έφεραν JAK2V617F και μόνο 1 ήταν ετερόζυγος για VLeiden. Επίκτητο σύνδρομο von Willebrand δεν παρατηρήθηκε. Υψηλότερα επίπεδα vWF μετρήθηκαν σε ασθενείς με θρομβωτικό ιστορικό σε συγκριση με την ομάδα μαρτύρων ($P < 0.003$) και με ασθενείς χωρίς θρόμβωση (μέσο vWFAg 133.82 και 77 U/dI αντίστοιχα). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, η μετάλλαξη JAK2V617F ($P < 0.036$), τα σταθερά επίπεδα του vWFAg ($P < 0.030$) και ο λόγος (ppvWF/vWF) (0.044) ήταν ανεξάρτητοι παράγοντες σε σχέση με τη θρόμβωση. Στην μελέτη αυτή τα σταθερά επίπεδα του vWFAg σχετίστηκαν με την θρόμβωση. Ο λόγος (ppvWF/vWF) διαφοροποιήθηκε όσον αφορά το θρομβωτικό ιστορικό, προτείνοντας ότι σε ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα με θρόμβωση, η σύνθεση και ο καθαρισμός του ώριμου vWF επηρεάστηκαν ισάξια, ενώ σε ασθενείς που δεν πάσχουν από θρόμβωση, ο αυξημένος καθαρισμός του vWF μπορεί να ισορροπήσει τη διάθεση για υπερπήξη. Βρέθηκε επίσης χαμηλότερη δραστηριότητα ADAMTS13 αλλά όχι μη φυσιολογική στους ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα. Σε συμφωνία με την βιβλιογραφία η JAK2V617F βρέθηκε ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου σχετικός με τη θρόμβωση. Τέλος, οι συγγραφείς πρότειναν επιτακτική την ανάγκη για πιθανές περαιτέρω μετρήσεις ώστε να διαπιστωθεί η προγνωστική αξία σε σταθερή κατάσταση των αρνητικών για χρωμόσωμα Philadelphia μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (Adamidou et al., 2010).

Σημαντικό χαρακτηριστικό των χρόνιων μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (MPNs), ιδιαίτερα της πολυκυτταραιμίας (PV) και της βασικής θρομβοκυτταραιμίας (ET), είναι ο υψηλός κίνδυνος αρτηριακής και φλεβικής θρόμβωσης (Finazzi et al., 2013). Έτσι, μας δώθηκε έναυσμα για διερεύνηση της συσχέτισης των μυελοϋπερπλαστικών διαταραχών με την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13.

Η PV και η ET είναι δύο αρνητικά για το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα (MPN) που σχετίζονται με μια επίκτητη μετάλλαξη στο γονίδιο JAK2 κινάσης τυροσίνης. Υπάρχει μια σπάνια περίπτωση, να εξελιχθούν σε μυελοϊνωση ή μυελοειδή μεταπλασία, οι οποίες μπορεί ή όχι να προηγούνται του μετασχηματισμού σε οξεία μυελογενή λευχαιμία, αλλά η θρόμβωση είναι η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας. Η παθοφυσιολογία της θρόμβωσης σε ασθενείς με MPN

είναι πολύπλοκη. Συμβατικά, οι ανωμαλίες του αριθμού και της λειτουργίας των αιμοπεταλίων αξιολογήθηκαν ως κύριοι παράγοντες, αλλά αυξημένες δυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αιμοπεταλίων, των λευκοκυττάρων και του ενδοθηλίου πιθανώς αντιπροσωπεύουν μια θεμελιώδη αλληλεπίδραση στη δημιουργία μιας θρομβοφιλικής κατάστασης. Επιπλέον, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, ένας πολύ γνωστός παράγοντας κινδύνου για αγγειακές παθήσεις, μπορεί να παίζει ένα ρόλο στον θρομβωτικό κίνδυνο των ασθενών με PV και ET. Η ταυτοποίηση των δεικτών πλάσματος που μεταφράζουν την αιμοστατική ανισορροπία σε ασθενείς με PV και ET θα ήταν εξαιρετικά χρήσιμη για τον καθορισμό της υποομάδας των ασθενών με σημαντικό κλινικό κίνδυνο θρόμβωσης (Vianello et al., 2011).

Πολλοί παράγοντες είναι πιθανόν να συμβάλλουν στην παθογένεση της θρόμβωσης, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης κυτταρικής μάζας (σε PV), τον αριθμό των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων, την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων και την αλληλεπίδρασή τους με συσσωματώματα αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων, και ακόμη των προθρομβωτικών κυκλοφορούντων και ενδοθηλιακών παραγόντων. Ακόμη και εν απουσία προφανούς θρόμβωσης, οι ασθενείς με MPN παρουσιάζουν χαρακτηριστική υπερπηκτική κατάσταση με αυξημένη συγκέντρωση αρκετών δεικτών πλάσματος ενεργοποίησης του αιμοστατικού συστήματος. Μεταξύ των προτεινόμενων μηχανισμών είναι η ενεργοποίηση της θρόμβωσης που προκαλείται από τον αυξημένο αριθμό και την κατάσταση ενεργοποίησης των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων, ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων (Vianello et al., 2011).

Φυσιολογικά, το ενδοθήλιο διευκολύνει τη ροή του αίματος παρέχοντας μια αντιθρομβωτική επιφάνεια που εμποδίζει την πρόσφυση των αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση της πήξης. Αρκετοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν τη λειτουργία του ενδοθηλίου σε ασθενείς με MPN. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων που παρατηρούνται σε PV και ET μπορεί να διαταράζει την κατάσταση ηρεμίας του ενδοθηλίου και να το μετατρέψουν σε μια επιφάνεια που μπορεί να προκαλέσει προθρομβωτική κατάσταση. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν ROS και ενδοκυτταρικές πρωτεάσες, οι οποίες μπορούν να δράσουν σε ενδοθηλιακά κύτταρα τροποποιώντας την αιμοστατική ισορροπία προς μια προθρομβωτική κατάσταση. Οι πρωτεάσες μπορούν να προκαλέσουν αποκόλληση ή λύση των ενδοθηλικών κυττάρων επηρεάζοντας τις λειτουργίες που εμπλέκονται στην θρομβοεμβολή (Harlan et al., 1981). Είναι σημαντικό ότι έχει αποδειχθεί ότι η βλάβη του ενδοθηλίου καθορίζει την απελευθέρωση στην κυκλοφορία συγκεκριμένων δεικτών, όπως ο vWF. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στην παθογένεση της θρόμβωσης σε MPN καθώς, όταν τα αιμοπετάλια συνδέονται με vWF, ενεργοποιούνται και στη συνέχεια μπορούν να συσσωματώσουν και να ενισχύσουν τον θρόμβο. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί εν μέρει να συμπέσει με την παρατηρούμενη υψηλή συχνότητα εμφάνισης θρόμβωσης σε ασθενείς με MPN (Falanga et al., 2000; Friedenberget al., 1992; Weksler et al., 1989). Άλλοι δείκτες πλάσματος του ενδοθηλίου, των αιμοπεταλίων και της ενεργοποίησης λευκοκυττάρων θα ήταν καλό να μελετηθούν, με στόχο τον καλύτερο προσδιορισμό του κινδύνου θρόμβωσης σε ασθενείς με PV και ET (Vianello et al., 2011).

Αν και η αιμορραγική διάθεση σε ET ασθενείς με ακραία θρομβοκυττάρωση έχει συχνά αποδοθεί στο AVWS, η λεπτομερής κατανόηση του τρόπου με τον οποίο αναπτύσσεται αυτή η κατάσταση παραμένει ασαφής. Η πιο αποδεκτή θεωρία είναι ότι τα αυξημένα αιμοπετάλια συνδέονται με προθρομβωτικά υπερμεταβλητά πολυμερή VWF και τα αφαιρούν από το πλάσμα. Επιπροσθέτως, η αυξημένη διάσπαση του VWF έχει επίσης συσχετιστεί με τον αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων σε ET ασθενείς με αιμορραγικές επιπλοκές (Etheridge et al., 2014) και εδώ ίσως εμπλέκεται η διάσπαση του vWF από την ADAMTS13.

Η σημασία των EC επιβεβαιώνεται από την έκφραση JAK2V617F σε ECs ασθενών με MPNs και μάλιστα υποδηλώνουν ότι η έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης μπορεί να είναι υπεύθυνη για τη θρόμβωση σε PV ασθενείς με Σύνδρομο Budd - Chiari (Etheridge et al., 2014). Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η αιμορραγική διάσταση που παρατηρήθηκε σε έναν αριθμό ασθενών με MPN μπορεί να οφείλεται στην έκφραση JAK2V617F σε ECs και σε αιματοποιητικά κύτταρα. Έχει προταθεί ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου η μετάλλαξη του JAK2 συμβάλλει στον φαινότυπο αιμορραγίας διαμέσου της ρύθμισης του VWF. Ωστόσο, είναι πολύ πιθανό ότι αρκετοί άλλοι, μέχρι τώρα άγνωστοι, μηχανισμοί συνεισφέρουν στα προκαλούμενα από EC θρομβοεγχειρητικά συμβάντα στα MPN. Απαιτούνται περαιτέρω εργασίες για τον πλήρη χαρακτηρισμό της έκφρασης των αιμοστατικών πρωτεϊνών στα JAK2V617F⁺ EC. Θα είναι επίσης ιδιαίτερα σημαντικό να συγκριθεί η έκφραση αιμοστατικών παραγόντων σε EC που έχουν απομονωθεί από διάφορα σημεία του αγγειακού δέντρου. Είναι πιθανό τα JAK2V617F⁺ EC να είναι αντιθρομβωτικά σε ορισμένους ιστούς και προθρομβωτικά σε άλλα, παρέχοντας μια νέα εξήγηση για τη μεταβλητότητα των θρομβοεγχειρητικών συμβαμάτων σε ασθενείς με MPN (Etheridge et al., 2014).

Η σημασία της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS13 στη ρύθμιση VWF αποδεικνύεται από τη σχέση μεταξύ της σοβαρής ανεπάρκειας της ADAMTS13 και της θρομβωτικής θρομβοκυτταροπενικής πορφύρας (TTP). Ωστόσο, τα επίπεδα δραστηριότητας ADAMTS13 δεν συσχετίζονται πάντοτε με την κλινική πορεία της TTP, υποδηλώνοντας ότι άλλες πρωτεάσες θα μπορούσαν να είναι σημαντικές στη ρύθμιση του VWF. Οι Raife et al., εντόπισαν 4 πρωτεάσες λευκοκυττάρων που διασπούν το συνθετικό υπόστρωμα VWF FRETs-VWF73 και το πολυμερικό VWF. Η ελαστάση και η πρωτεΐνωση 3 (PR3) διασπούν το πολυμερές VWF και FRETs-VWF73 στον δεσμό πεπτιδίου V 1607 -T 1608, η καθεψίνη G και η μεταλλοπρωτεάση μήτρας 9 (MMP9) διασπούν τα υποστρώματα VWF στο Y 1605- M1606 και M 1606- V 1607, αντιστοίχως. Απομονωμένα ανθρώπινα ουδετερόφιλα διασπούν τον FRETs-VWF73 στον πεπτιδικό δεσμό V 1607 -T 1608, υποδηλώνοντας ότι η ελαστάση ή η PR3 που εκφράζεται σε επιφάνειες λευκοκυττάρων μπορεί να διασπάσει τον VWF. Παρουσία κανονικού πλάσματος ή πλάσματος με ανεπάρκεια ADAMTS13, καταργείται η διάσπαση του FRETs-VWF73 από τα ουδετερόφιλα σε ηρεμία. Εντούτοις, τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα διατηρούν την πρωτεολυτική δραστηριότητα έναντι του FRETs-VWF73 παρουσία πλάσματος. Αν και η σχετικότητα in vivo παραμένει προς επιβεβαίωση, αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός "hot spot" πρωτεόλυσης του VWF στην περιοχή A2 και υποστηρίζουν την

πιθανότητα ότι ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα μπορούν να συμμετέχουν στην πρωτεολυτική ρύθμιση του VWF (Raife et al., 2009).

Σημαντικό είναι επίσης, ότι οι αγγειακές επιπλοκές αποτελούν την κύρια αιτία της νοσηρότητας στην PV και ET. Έτσι, οι Musolino et al., διερεύνησαν τις συγκεντρώσεις της διαλυτής P-σελεκτίνης (sP-Sel.), της διαλυτής E-σελεκτίνης (sE-Sel.) και της διαλυτής θρομβομοντουλίνης (sTM) στο πλάσμα σε σχέση με την παρουσία θρομβοεμβολικών επεισοδίων σε ασθενείς με Χρόνιες Μυελοϋπερπλαστικές Διαταραχές (CMD). Το αποτέλεσμα στο οποίο κατέληξαν ήταν ότι η παρατεταμένη ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων παρατηρούνται σε ασθενείς με ET και PV και μπορεί να συμβάλλουν στην παθογένεση των θρομβοεμβολικών συμβάντων σε αυτούς τους ασθενείς (Musolino et al., 2000).

Η έρευνα των Weber et al. επικεντρώθηκε στο γεγονός ότι η ενήλικη αιματοποίηση απαιτεί στενά ρυθμιζόμενες αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου μεταξύ των αιμοποιητικών κυττάρων και του στρωματικού μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών. Έτσι, διερεύνησαν το ερώτημα αν η ADAM10 είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της ενήλικης αιματοποίησης. Η επαγόμενη εξάλειψη της ADAM10 σε αιματοποιητικά κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα μορφολογικές και ιστολογικές ανωμαλίες που μοιάζουν με μη ταξινομημένη μυελο-πολλαπλασιαστική διαταραχή (MPD). Ανάλυση έκφρασης της ADAM10 κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων της MPD αποκάλυψε ότι μη στοχευμένα αιματοποιητικά κύτταρα επαναποικίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ποντικών που δεν είχαν ADAM10. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι απαιτείται μια αυστηρά ελεγχόμενη έκφραση ADAM10 για την εξισορρόπηση των αποφάσεων για την μοίρα των αιμοποιητικών κυττάρων (Weber et al., 2013). Επομένως, λόγω αυτού του ευρήματος δίνεται έναυσμα για τη διερεύνηση της εμπλοκής της ADAMTS13 στα μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα, καθώς η ADAM10 και η ADAMTS13 ανήκουν σε συγγενείς οικογένειες.

Μελλοντικοί στόχοι

Δεδομένου ότι οι έρευνες που συσχετίζουν την ADAMTS13 με τα μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα είναι ελάχιστες, προτείνεται η περαιτέρω διερεύνηση αυτής της πιθανής συσχέτισης καθώς υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις για εμπλοκή της ADAMTS13 στο μηχανισμό των μυελοϋπερπλαστικών διαταραχών. Επιπλέον θα πρέπει να διερευνηθούν περισσότερο οι παράγοντες όπως ο vLeiden, ο vWF, ο παράγοντας πήξης VIII, η P - σελεκτίνη καθώς και άλλοι, σε σχέση με τα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα καθώς επίσης και οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους αυτοί οι παράγοντες εμπλέκονται σε αυτά. Τελευταίο αλλά εξίσου σημαντικό είναι να διεκρινιστούν πλήρως οι μοριακοί μηχανισμοί των μυελοϋπερπλαστικών διαταραχών ώστε να είναι πιο εύκολη η αντιμετώπισή τους.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ai J, Smith P, Wang S, et al. The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 2005; 280:29428–29434
2. Akiyama M, Takeda S, Kokame K, et al. Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:19274–19279.
3. Banno F, Chauhan AK, Kokame K, et al. The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation. *Blood*. 2009; 113:5323–5329.
4. Bao J, Xiao J, Mao Y, et al. Carboxyl terminus of ADAMTS13 directly inhibits platelet aggregation and ultra large von Willebrand factor string formation under flow in a free-thiol-dependent manner. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2014; 34:397–407
5. Baxter EJ, et al. Cancer Genome Project Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365(9464):1054–1061
6. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008; 112:141-149.
7. Beer, PA; Green, AR. "Pathogenesis and management of essential thrombocythemia". *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program: 2009. 621–8. doi:10.1182/asheducation-2009.1.621. PMID 20008247.
8. Bench AJ, White HE, Foroni L, et al. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *Br J Haematol*. 2013; 160:25-34.
9. Berk, P.D., Goldberg, J.D., Silverstein, M.N., Weinfeld, A., Donovan, P.B., Ellis, J.T., Landaw, S.A., Laszlo, J., Najean, Y., Pisciotto, A.V. & Wasserman, L.R. (1981) Increased incidence of acute leukemia in polycythemia vera associated with chlorambucil therapy. *New England Journal of Medicine*, 304, 441–447.
10. Berlin NI. Diagnosis and classification of polycythemias. *Semin Hematol*. 1975. 12: 339
11. Budde, U. & van Genderen, P.J. (1997) Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 23, 425–431.
12. Budde, U., Scharf, R.E., Franke, P., Hartmann-Budde, K., Dent, J. & Ruggeri, Z.M. (1993) Elevated platelet count as a cause of abnormal von Willebrand factor multimer distribution in plasma. *Blood*, 82, 1749–1757.
13. Cao W, Krishnaswamy S, Camire RM, et al. Factor VIII accelerates proteolytic cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105:7416–21.

14. Castaman G, Lattuada A, Ruggeri M, Tosetto A, Mannucci PM, Rodeghiero F. Platelet von Willebrand factor abnormalities in myeloproliferative syndromes. *Am J Hematol.* 1995 Aug; 49(4):289-93.
15. Catherine B. Zander, Wenjing Cao και X. Long Zheng. ADAMTS13 and von Willebrand factor interactions. *Curr Opin Hematol.* 2015 Sep; 22 (5): 452-459.
16. Cécile Denis and Peter J. Lenting. von Willebrand factor: at the crossroads of bleeding and thrombosis. *Int J Hematol.* 2012 Apr; 95(4): 353–361.
17. Cortelazzo, S., Finazzi, G., Ruggeri, M., Vestri, O., Galli, M., Rodeghiero, F. & Barbui, T. (1995) Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *New England Journal of Medicine*, 332, 1132–1136.
18. Crawley JT, de Groot R, Xiang Y, et al. Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood.* 2011; 118:3212–3221.
19. D Adamidou, E Rouka, M Palasopoulou, N Giannakoulas, D Bartzoudis, E Bouronikou, G Vassilopoulos, P Matsouka, D Kyriakou. Thrombosis in relation to von Willebrand Factor, vWF propeptide and ADAMTS13 protease levels in Philadelphia chromosome negative myeloproliferative neoplasms. *Blood Donation Center – University of Larisa, Larisa, Greece; Haematology Clinic – University Hospital of Larisa, Larisa, Greece. Haematologica.* 2010; 95(s2)
20. De Ceunynck K, Rocha S, Feys HB, De Meyer SF, Uji-i H, Deckmyn H, et al. Local elongation of endothelial cell-anchored von Willebrand factor strings precedes ADAMTS13 protein-mediated proteolysis. *J Biol Chem.* 2011; 286:36361–7.
21. de Groot R, Bardhan A, Ramroop N, et al. Essential role of the disintegrin-like domain in ADAMTS13 function. *Blood.* 2009; 113:5609–5616.
22. Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, Kasper CK, Ruggeri ZM. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 6306-6310.
23. Elaine Sarkin Jaffe, Nancy Lee Harris, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Harald Stein, J.W. Vardiman. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 2001. World Health Organization Classification of Tumors. 3. Lyon: IARC Press. ISBN 92-832-2411-6.
24. Falanga, A., Marchetti, M., Evangelista, V., Vignoli, A., Licini, M., Balicco, M., Manarini, S., Finazzi, G., Cerletti, C. & Barbui, T. (2000) Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*, 96, 4261–4266.
25. Finazzi G, De Stefano V, Barbui T. Are MPNs vascular diseases? *Curr Hematol Malig Rep.* 2013 Dec; 8(4):307-16. doi: 10.1007/s11899-013-0176-z.
26. Friedenbergl, W.R., Roberts, R.C., and David, D.E. (1992) Relationship of thrombohemorrhagic complications to endothelial cell function in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Am. J. Hematol.* 40, 283–289.

27. Fu X, Chen J, Gallagher R, Zheng Y, Chung DW, Lopez JA. Shear stress-induced unfolding of VWF accelerates oxidation of key methionine residues in the A1A2A3 region. *Blood*. 2011; 118:5283–91.
28. Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, et al. Purification of human von Willebrand factor–cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*. 2001; 98:1662–66. [PubMed]
29. Furlan M, Robles R, Lammle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*. 1996; 87:4223–34.
30. Gallia G, Levy, David G. Motto and David Ginsburg. ADAMTS13 turns 3. *Blood*. 2005; 106: 11-17
31. Ganderton T, Berndt MC, Chesterman CN, Hogg PJ. Hypothesis for control of von Willebrand factor multimer size by intra-molecular thiol-disulphide exchange. *J Thromb Haemost*. 2007; 5:204–6.
32. Gao W, Anderson PJ, Majerus EM, et al. Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:19099–19104
33. Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, et al. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor–cleaving protease. *Blood*. 2001; 98:1654–61. [PubMed]
34. Harlan, J.M., Killen, P.D., Harker, L.A., Striker, G.E., and Wright, D.G. (1981) Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro mechanisms of cell detachment. *J. Clin. Invest*. 68, 1394–1403.
35. Horny HP, Sotlar K, Valent P. "Mastocytosis: state of the art". *Pathobiology*. 2007. 74 (2): 121–32. doi:10.1159/000101711. PMID 17587883.
36. Jensen, M.K., de Nully Brown, P., Lund, B.V., Nielsen, O.J. & Hasselbalch, H.C. (2000b) Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. *British Journal of Haematology*, 110, 116–124.
37. Jin SY, Skipwith CG, Zheng XL. Amino acid residues Arg(659), Arg(660), and Tyr(661) in the spacer domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor. *Blood*. 2010; 115:2300–2310.
38. Klonizakis P, Tselios K, Sarantopoulos A, Gougourellas I, Rouka E, Onufriadou Z, Kapali P, Kyriakou D, Boura P. ADAMTS-13 metalloprotease abnormalities in systemic lupus erythematosus: is there a correlation with disease status? *Lupus*. 2013 Apr; 22(5):443-52. doi: 10.1177/0961203313477898.
39. Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. *Blood* 2004; 103:607.
40. Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, Tamai H, Konno M, Kamide K, Kawano Y, Miyata T, Fujimura Y. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 11902–11907.
41. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. *Br. J. Haematol* 2005; 129:93.
42. Kume Y, Ikeda H, Inoue M, et al. Hepatic stellate cell damage may lead to decreased plasma ADAMTS13 activity in rats. *FEBS Lett*. 2007; 581:1631–34.

43. Lambert Busque, MD, Anna Porwit, MD, Radmila Day, MSc, Harold J. Olney, MD, Brian Leber, MD, Vincent Ethier, MD, Shireen Sirhan, MD, Linda Foltz, MD, Jaroslav Prchal, MD, Suzanne Kamel-Reid, PhD, Aly Karsan, MD, and Vikas Gupta, MD. Recommendations of the Canadian MPN Group. Laboratory Investigation of Myeloproliferative Neoplasms (MPNs). *Am J Clin Pathol* October 2016; 146:408-422 DOI: 10.1093/AJCP/AQW131
44. Lämmle B, George JN. *Seminars in Hematology* 2004; 41:1:1.
45. Lämmle B, Kremer Hovinga JA, Alberio L. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1663.
46. Landolfi, R., Ciabattini, G., Patrignani, P., Castellana, M.A., Pogliani, E., Bizzi, B. & Patrono, C. (1992) Increased thromboxane biosynthesis in patients with polycythemia vera: evidence for aspirin-suppressible platelet activation in vivo. [see comment]. *Blood*, 80, 1965–1971.
47. Landolfi, R., Rocca, B. & Patrono, C. (1995) Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders: mechanisms and treatment. *Critical Reviews in Oncology-Hematology*, 20, 203–222.
48. Le Blanc, K., Lindahl, T., Rosendahl, K. & Samuelsson, J. (1998) Impaired platelet binding of fibrinogen due to a lower number of GPIIB/IIIA receptors in polycythemia vera. *Thrombosis Research*, 91, 287–295.
49. Lenting PJ, Pegon JN, Groot E, de Groot PG. Regulation of von Willebrand factor-platelet interactions. *Thromb Haemost.* 2010; 104:449–55
50. Lenting PJ, Rastegarlar G. ADAMTS-13: double trouble for von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2010; 8:2775–7.
51. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005; 7:387-397.
52. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R, Sarode R, Shurin SB, Chandrasekaran V, Stabler SP, Sabio H, Bouhassira EE, Upshaw JD Jr, Ginsburg D, Tsai HM. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature.* 2001; 413: 488–494.
53. Li Y, Choi H, Zhou Z, Nolasco L, Pownall HJ, Voorberg J, et al. Covalent regulation of ULVWF string formation and elongation on endothelial cells under flow conditions. *J Thromb Haemost.* 2008; 6:1135–43.
54. Lister Hill National Center for Biomedical Communications. ADAMTS13 gene. March 27, 2018
55. M. A. Elliott A. Tefferi. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *British Journal of Haematology.* 2005 February; 128(3):275-290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05277.x>
56. Manea M, Kristoffersson A, Schneppenheim R, et al. Podocytes express ADAMTS13 in normal renal cortex and in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 2007; 138:651–62.
57. Mazzucato, M., De Marco, L., De Angelis, V., De Roia, D., Bizzaro, N. & Casonato, A. (1989) Platelet membrane abnormalities in myeloproliferative

- disorders: decrease in glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex is associated with deficient receptor function. *British Journal of Haematology*, 73, 369–374.
58. McGrath RT, van den Biggelaar M, Byrne B, et al. Altered glycosylation of platelet-derived von Willebrand factor confers resistance to ADAMTS13 proteolysis. *Blood*. 2013; 122:4107–10.
 59. Meschengieser S, Blanco A, Woods A, Maugeri N, Fernandez J, Dupont J, Lazzari MA. Intraplatelet levels of VWF:Ag and fibrinogen in myeloproliferative disorders. *Thromb Res*. 1987 Nov 1; 48(3):311-9.
 60. Michiels JJ, et al. The paradox of platelet activation and impaired function: Platelet-von Willebrand factor interactions, and the etiology of thrombotic and hemorrhagic manifestations in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost*. 2006; 32(6):589–604.
 61. Michiels, J.J. (1997) Erythromelalgia and thrombocythemia: a disease of platelet prostaglandin metabolism–thesis, Rotterdam, 1981. *Seminars in Thrombosis Hemostasis*, 23, 335–338.
 62. Michiels, J.J., Abels, J., Steketee, J., van Vliet, H.H. & Vuzevski, V.D. (1985) Erythromelalgia caused by platelet-mediated arteriolar inflammation and thrombosis in thrombocythemia. *Annals of Internal Medicine*, 102, 466–471.
 63. Musolino C, Alonci A, Bellomo G, Tringali O, Spatari G, Quartarone C, Rizzo V, Calabrò L, Bagnato G, Frisina N. Myeloproliferative Disease: Markers of Endothelial and Platelet Status in Patients with Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera. *Hematology*. 2000; 4(5):397-402
 64. Nakashima MO, Zhang X, Rogers HJ, Vengal L, Gibson B Jr, Daly TM, Kottke-Marchant K. Validation of a panel of ADAMTS13 assays for diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura: activity, functional inhibitor, and autoantibody test. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2016 Oct; 38(5):550-9. doi: 10.1111/ijlh.12542. Epub 2016 Jul 20.
 65. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013; 369:2391-2405.
 66. Niiya M, Uemura M, Zheng XW, et al. Increased ADAMTS-13 proteolytic activity in rat hepatic stellate cells upon activation in vitro and in vivo. *J. Thromb. Haemost*. 2006; 4:1063–70.
 67. Nishino M, Girma JP, Rothschild C, Fressinaud E, Meyer D. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood*. 1989; 74:1591–9.
 68. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960; 132:1497.
 69. Pos W, Crawley JT, Fijnheer R, et al. An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF. *Blood*. 2010; 115:1640–1649.
 70. Provan, D; Gribben, JG. Chapter 7 Chronic myelogenous leukemia. *Molecular Hematology*. 3rd edition. 2010. Singapore: Wiley – Blackwell. p.76.

71. Qian Z, Gelzer-Bell R, Yang SX, et al. Inducible nitric oxide synthase inhibition of weibel-palade body release in cardiac transplant rejection. *Circulation*. 2001; 104:2369-2375.
72. Raife TJ, Cao W, Atkinson BS, Bedell B, Montgomery RR, Lentz SR, Johnson GF, Zheng XL. Leukocyte proteases cleave von Willebrand factor at or near the ADAMTS13 cleavage site. *Blood*. 2009 Aug 20;114(8):1666-74. doi: 10.1182/blood-2009-01-195461. Epub 2009 Jun 18.
73. Rapado I, Grande S, Albizua E, et al. High resolution melting analysis for JAK2 exon 14 and exon 12 mutations: a diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms. *J Mol Diagn*. 2009; 11:155-161.
74. Rayes J, Hommais A, Legendre P, Tout H, Veyradier A, Obert B, et al. Effect of von Willebrand disease type 2B and type 2M mutations on the susceptibility of von Willebrand factor to ADAMTS-13. *J Thromb Haemost*. 2007; 5:321-8.
75. Reininger AJ. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia*. 2008; 14 (Suppl 5):11-26
76. Reiter A, Gotlib J. "Myeloid neoplasms with eosinophilia". *Blood*. 2017. 129 (6): 704-714. doi:10.1182/blood-2016-10-695973. PMID 28028030.
77. Rieger M, Ferrari S, Kremer Hovinga JA, et al. Relation between ADAMTS13 activity and ADAMTS13 antigen levels in healthy donors and patients with thrombotic microangiopathies (TMA) *Thromb. Haemost*. 2006; 95:212-20.
78. Ruggeri ZM, Zimmerman TS. The complex multimeric composition of Factor VIII/ von Willebrand Factor. *Blood*. 1981; 57: 1140-1143.
79. S. Leah Etheridge, Michelle E. Roh, Megan E. Cosgrove, Veena Sangkhae, Norma E. Fox, Junmei Chen, José A. López, Kenneth Kaushansky, and Ian S. Hitchcock. JAK2V617F-positive endothelial cells contribute to clotting abnormalities in myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 11; 111(6): 2295-2300. Published online 2014 Jan 27. doi: 10.1073/pnas.1312148111
80. Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, Gorzelanny C, Alexander-Katz A, Netz RR, et al. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:7899-903.
81. Schneppenheim R, Budde U. von Willebrand factor: the complex molecular genetics of a multidomain and multifunctional protein. *J Thromb Haemost*. 2011; 9 (Suppl 1):209-15.
82. Schulman I, Pierce M, Lukens A, Currimbhoy Z. Studies on thrombopoiesis, I: a factor in normal human plasma required for platelet production; chronic thrombocytopenia due to its deficiency. *Blood*. 1960; 16: 943-957.
83. Shang D, Zheng XW, Niiya M, et al. Apical sorting of ADAMTS13 in vascular endothelial cells and Madin-Darby canine kidney cells depends on the CUB domains and their association with lipid rafts. *Blood*. 2006; 108:2207-15.
84. Skipwith CG, Cao W, Zheng XL. Factor VIII and platelets synergistically accelerate cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13 under fluid shear stress. *J. Biol. Chem*. 2010; 285:28596-603.

85. Springer TA. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. *J Thromb Haemost.* 2011; 9 (Suppl 1):130–43.
86. Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, et al. Detection of von Willebrand factor–cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 313:212–16.
87. Szuber N, Lamontagne B, Busque L. Novel germline mutations in the calreticulin gene: implications for the diagnosis of myeloproliferative neoplasms. *J Clin Pathol.* 2016. doi:10.1136/jclinpath-2016-203940 [epub ahead of print]
88. Tatewaki W, Takahashi H, Hanano M, Shibata A. Multimeric composition of plasma von Willebrand factor in chronic myelocytic leukaemia. *Thromb Res.* 1988 Oct 1;52(1):23-32.
89. Tauchi R, Imagama S, Ohgomori T, et al. ADAMTS-13 is produced by glial cells and upregulated after spinal cord injury. *Neurosci. Lett.* 2012; 517:1–6.
90. Tefferi A, Smock KJ, Divgi AB. Polycythemia vera–associated acquired von Willebrand syndrome despite near-normal platelet count. *Am J Hematol.* 2010;85:545
91. Tefferi, Ayalew. "Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management". *American Journal of Hematology.* 2014. 89 (9): 915–925. doi:10.1002/ajh.23703. ISSN 0361-8609
92. Tsai Han-Mou. Platelet Activation and the Formation of the Platelet Plug. Deficiency of ADAMTS13 Causes Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2003; 23:388-396. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000058401.34021.D4>
93. Tsai HM, Nagel RL, Hatcher VB, Sussman II. Multimeric composition of endothelial cell-derived von Willebrand factor. *Blood.* 1989; 73: 2074-2076.
94. Tsai HM, Nagel RL, Sussman, II. Subunit composition of plasma von Willebrand factor multimers: evidence for a non-proteolytic mechanism resulting in apparent increase in proteolytic fragments. *Thromb Res.* 1991; 63: 179-188.
95. Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood.* 1996; 87:4235–44.
96. Tsai HM. Platelet activation and the formation of the platelet plug: deficiency of ADAMTS13 causes thrombotic thrombocytopenic purpura. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Mar 1; 23(3):388-96. Epub 2003 Jan 30.
97. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Tsigiotis P, et al. Direct evidence for normalization of platelet function resulting from platelet count reduction in essential thrombocythemia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2011; 22:457-462.
98. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, et al. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood.* 2005; 106:922–24.
99. Ugo V, Tondeur S, Menot ML, et al. Interlaboratory development and validation of a HRM method applied to the detection of JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera patients. *PLoS One.* 2010; 5:e8893.

100. Upshaw JD Jr. Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 1978; 298: 1350–1352.
101. Ushikubi, F., Okuma, M., Ishibashi, T., Narumiya, S. & Uchino, H. (1990) Deficient elevation of the cytoplasmic calcium ion concentration by epinephrine in epinephrine-insensitive platelets of patients with myeloproliferative disorders. *American Journal of Hematology*, 33, 96–100.
102. van Genderen, P.J., Lucas, I.S., van Strik, R., Vuzevski, V.D., Prins, F.J., van Vliet, H.H. & Michiels, J.J. (1996a) Erythromelalgia in essential thrombocythemia is characterized by platelet activation and endothelial cell damage but not by thrombin generation. *Thrombosis and Haemostasis*, 76, 333–338.
103. van Genderen, P.J., Michiels, J.J., van Strik, R., Lindemans, J. & van Vliet, H.H. (1995) Platelet consumption in thrombocythemia complicated by erythromelalgia: reversal by aspirin. *Thrombosis and Haemostasis*, 73, 210–214.
104. van Schie MC, van Loon JE, de Maat MP, Leebeek FW. Genetic determinants of von Willebrand factor levels and activity in relation to the risk of cardiovascular disease: a review. *J Thromb Haemost.* 2011; 9:899–908.
105. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 5578–5582.
106. Vannucchi A, Guglielmelli P, Rotunno G, et al. Mutation-enhanced international prognostic scoring system (MIPSS) for primary myelofibrosis: an AGIMM & IWG-MRT project [abstract]. *Blood.* 2014; 124:405
107. Vianello F, Battisti A, Cella G, Marchetti M, Falanga A. Defining the thrombotic risk in patients with myeloproliferative neoplasms. *ScientificWorldJournal.* 2011 May 26; 11:1131-7. doi: 10.1100/tsw.2011.108.
108. Wagner DD, Marder VJ. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1983; 258: 2065–2067.
109. Wagner DD. Storage and secretion of von Willebrand factor. In: Ruggeri ZM, Zimmerman TS, eds. *Coagulation and Bleeding Disorders: The Role of Factor VIII and von Willebrand Factor*. New York and Basel: Marcel Dekker; 1989: 161–180.
110. Wagner DD. The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thromb Haemost.* 1993; 70: 105–110.
111. Watanabe N, Ikeda H, Kume Y, et al. Increased production of ADAMTS13 in hepatic stellate cells contributes to enhanced plasma ADAMTS13 activity in rat models of cholestasis and steatohepatitis. *Thromb. Haemost.* 2009; 102:389–96.
112. Weber S, Wetzel S, Prox J, Lehmann T, Schneppenheim J, Donners M, Saftig P. Regulation of adult hematopoiesis by the α disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10). *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Dec 13; 442(3-4):234–41. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.020. Epub 2013 Nov 15.

113. Wehmeier, A., Fricke, S., Scharf, R.E. & Schneider, W. (1990) A prospective study of haemostatic parameters in relation to the clinical course of myeloproliferative disorders. *European Journal of Haematology*, 45, 191–197.
114. Weksler, B.B., Jaffe, E.A., Brower, M.S., and Cole, O.F. (1989) Human leukocyte cathepsin G and elastase specifically suppress thrombin-induced prostacyclin production in human endothelial cells. *Blood* 74, 1627–1634.
115. Wong CL, Ma ES, Wang CL, et al. JAK2 V617F due to a novel TG ! CT mutation at nucleotides 1848-1849: diagnostic implication. *Leukemia*. 2007; 21:1344-1346.
116. Wu, K.K. (1978) Platelet hyperaggregability and thrombosis in patients with thrombocythemia. *Annals of Internal Medicine*, 88, 7–11.
117. X. Long Zheng. ADAMTS13 and von Willebrand Factor in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Annu Rev Med*. 2015; 66: 211–225.
118. Xiang Y, de Groot R, Crawley JT, et al. Mechanism of von Willebrand factor scissile bond cleavage by a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:11602–11607.
119. Yeh HC, Zhou Z, Choi H, et al. Disulfide bond reduction of von Willebrand factor by ADAMTS-13. *J. Thromb. Haemost.* 2010; 8:2778–88
120. Zanardelli S, Chion AC, Groot E, et al. A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood*. 2009; 114:2819–2828.
121. Zhang P, Pan W, Rux AH, et al. The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow. *Blood*. 2007; 110:1887–1894.
122. Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al. Structure of von Willebrand factor–cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Biol. Chem*. 2001; 276:41059–63
123. Zhou W, Inada M, Lee TP, et al. ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab. Invest*. 2005; 85:780–88.
124. Λουκόπουλος Δ.. ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΙΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ. Κεφάλαιο 7. Αθήνα, 2015